



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

MECANISMOS DE TRANSPORTE CELULAR, CINÉTICA DE
ACUMULACIÓN Y EFECTOS TÓXICOS DE MICROCISTINA-LR EN
PECES PATAGÓNICOS DE AGUA DULCE

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctora en Biología

Lic. Flavia Bieczynski

Director: Dr. Carlos Marcelo Luquet

Codirector: Dr. Dante Agustín Paz

2014

Agradecimientos

..."Es un tiempo distinto y una medida distinta. Las distancias se dilatan y la meta se aleja con uno. En mitad del camino todo es remoto. El punto de partida, el punto de arribada"...



(Haroldo Conti, "Sudeste")

Desde el punto de partida hasta el punto de arribada, aunque el fin de esta tesis parecía muy lejano... quiero agradecer a todos los que me acompañaron en el camino y me acompañan día a día en mis proyectos, en especial a mis papás, Ceci y Carlos, a mis hermanos Ale y Leo y por supuesto a las chichis bahienses (Maju, Georgi, Ana C., Ana W. y Cin), que a pesar de la distancia fueron mis compañeras de doctorado, son y serán mis amigas biolocas y siempre están cuando necesito un consejo.

✓ Quiero agradecer en especial a mi director, el Dr. Carlos Luquet, que tantas veces volviera loco con mi ansiedad, dudas constantes, llantos espontáneos, enojos pasajeros...en fin...pero con quien a pesar de todo, compartimos buenos momentos de mates y discusiones experimentales. Agradezco lo mucho que me ayudó a superar los momentos difíciles de la tesis, el esfuerzo, paciencia y tiempo que invirtió y todo lo que aprendí bajo su dirección.

✓ A mi codirector, el Dr. Dante Paz. A pesar de haber viajado aterrada a su laboratorio (por las bromas que me comentaban que solía hacer a sus becarios), debo decir que al estar ahí, por suerte, me recibieron muy bien y fui perdiendo (un poquito) el miedo. Agradezco muchísimo toda la ayuda y buena predisposición de su parte y de su laboratorio.

- ✓ A los chicos del CEAN!! Sobre todo a Pablo Hualde, Jorge Kuroda, Walter Torres, Pablito Moreno, Mariela Demicheli, Leo Molinari, Luciana Piudo y Martín Monteverde, quienes nos abrieron las puertas de sus laboratorios y poco a poco permitieron que invadiéramos espacio, apareciéramos para pedir algún reactivo, seleccionar algunos peces para experimentos...en fin, muchísimas pero muchísimas gracias por su ayuda, sin la cual no habría podido hacer esta tesis.
- ✓ Quiero agradecer en especial a la Dra. Beatriz Brena, Macarena Pirez y Martín Rossotti, por la valiosa ayuda que me brindaron con las extracciones de microcistina, técnicas de ELISA y la amabilidad con la que me recibieron en Montevideo.
- ✓ A los Dres. Wayne Carmichael y Sandra Azevedo por proporcionarnos generosamente estándar de microcistina-LR para calibrar las técnicas del laboratorio.
- ✓ Al Dr. Aldo Mottino, Dra. Silvina Villanueva, Marcelo G. Luquita y todo el equipo de laboratorio IFISE. Gracias por su colaboración con anticuerpos, por recibirme con tanta amabilidad en su laboratorio, por su ayuda y buenos consejos, y su confianza en esta bióloga que un día apareció en Rosario hablando de intestino de peces.
- ✓ Al Dr. Andrés Venturino, por sus aportes en mi trabajo, por permitirme usar sus equipos e instalaciones en varias oportunidades. A las chicas de su laboratorio, Dras. Ana Ferrari y Ceci Lascano, Lic. Mariana Mardirosian.
- ✓ Al Dr. Eduardo Aisen, por ayudarme en el uso del microscopio de la Facultad de Ciencias Agrarias, Cinco Saltos.
- ✓ Al Dr. Amro M. Hamdoun, por otorgarnos generosamente Calceína-AM.
- ✓ A la Cooperativa de Agua y Saneamiento de San Martín de los Andes, por equipos materiales que nos brindaron.
- ✓ Al laboratorio del hospital de Junín de los Andes, en especial a Abel Zurschmitten y Hugo), por permitir que realizara mediciones enzimáticas

utilizando sus equipos de laboratorio, por donar material que necesitaba para unos experimentos, todo por suerte, sin pincharme para extraer sangre cada vez que fui.

✓ A CONICET, por brindarme la posibilidad de realizar esta tesis con financiación. Esta tesis fue financiada por becas de doctorado y por los subsidios PIP 0282 de CONICET y ANPCYT-PICT 00214.

✓ Al Dpto. de Posgrado del CRUB, por acompañarme durante toda la carrera de doctorado. Si bien por la distancia fue poco mi acercamiento, ante cualquier duda siempre recibí sus respuestas. Considero que el esfuerzo que realizan por acompañar a cada estudiante de doctorado a lo largo de la carrera la vuelve muy valiosa.

✓ A mis compañeros de laboratorio, sobre todo a Vir, Carlita, Juan y Juli, por su ayuda en los experimentos y su paciencia. A los primeros que estaban ahí cuando llegué, Mirna Ferrada, Mónica Pose y en especial a Fedra Granata por tenerme paciencia y enseñarme las técnicas del laboratorio.

RESUMEN

Palabras claves: *Cyanobacteria*; *Microcistina-LR*; *Odontesthes hatcheri*; *Oncorhynchus mykiss*; detoxificación; transportadores ABC; acumulación; estrés oxidativo.

En este trabajo se estudiaron los mecanismos de transporte a través del epitelio intestinal, la cinética de acumulación y los efectos tóxicos producidos por la cianotoxina microcistina-LR (MCLR), en dos especies de peces patagónicos de importancia económica y ecológica: el pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) y la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), potencialmente expuestos a floraciones de cianobacterias y a sus metabolitos tóxicos.

Se evaluó la capacidad de *O. hatcheri* de digerir cianobacterias y absorber MCLR a través de la administración de células de *Microcystis aeruginosa* tóxicas (productoras de MCLR) mezcladas con alimento comercial. En este experimento un grupo de peces recibió células de *M. aeruginosa* previamente rotas por métodos fisicoquímicos (MCLR libre) y otro grupo recibió las células intactas. En los dos casos, *O. hatcheri* acumuló MCLR en intestino e hígado, en igual proporción entre tratamientos, demostrando que esta especie es capaz de digerir la pared de las cianobacterias y de absorber la MCLR liberada en el tracto digestivo.

En un segundo experimento se determinaron los efectos tóxicos provocados por la absorción de MCLR en *O. hatcheri*. Un tratamiento consistió en administrar células rotas de *M. aeruginosa* tóxica mezcladas con el alimento comercial; otro grupo de peces recibió alimento comercial mezclado con células rotas de una cepa no tóxica de *M. aeruginosa* (control de los efectos provocados por otros componentes de las cianobacterias); y el grupo control recibió solamente alimento comercial. La concentración de MCLR administrada de esta forma representó una concentración subletal. Luego de una única alimentación, se estudió en hígado e intestino a lo largo del tiempo: actividad de la enzima proteína fosfatasa 1 (PP1), respuestas de estrés oxidativo (actividad de enzimas catalasa, CAT y glutatión-S-transferasa, GST) y daño oxidativo (peroxidación lipídica). Se determinó la acumulación de MCLR extraíble en metanol (fracción de MCLR acumulada en su forma nativa o conjugada con GSH, o cisteína) y como MCLR unida a proteínas. La fracción extraíble en metanol se cuantificó por ensayo de inhibición de PP1 *in vitro* (PPIA) y por oxidación de Lemieux-cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM). La fracción unida a proteínas se cuantificó por oxidación de Lemieux-CG/EM. Los resultados obtenidos indican que MCLR se acumula tanto en intestino como en hígado, mayormente unida a proteínas. La cantidad de toxina acumulada en ambos órganos disminuye a lo largo del tiempo hasta ser prácticamente indetectable a las 48 horas post-intoxicación. En cuanto a los efectos tóxicos, sólo el hígado presentó alteraciones leves. De estos resultados se desprende que *O. hatcheri* es una especie que puede ser afectada por floraciones de

cianobacterias tóxicas aunque esta especie sería capaz de metabolizar y eliminar la toxina acumulada, al menos a concentraciones subletales.

Se estudió la participación de proteínas de membrana Abcc (Mrp) (mediadoras de la defensa celular frente a xenobióticos junto con otras proteínas de la superfamilia ABC) en el transporte de MCLR a través del epitelio intestinal. Para esto, se incubaron preparaciones *ex vivo* de intestino de *O. hatcheri* y *O. mykiss* con sustratos específicos de las proteínas Abcc (DNP-SG y calceína) junto con MCLR y se determinaron las tasas específicas de transporte de cada sustrato en presencia de la toxina. Se compararon los resultados obtenidos con MCLR con los efectos provocados por MK571, inhibidor específico de transportadores Abcc. Por otro lado, se evaluaron los efectos tóxicos (actividad PP1, PP2A y GST, concentración de glutatión reducido) producidos por MCLR en segmentos de intestino incubados solamente con MCLR o en conjunto con MK571. Los resultados de estos experimentos indican que los enterocitos de *O. mykiss* y *O. hatcheri* son capaces de eliminar la MCLR acumulada hacia el lado luminal (detoxificación) o hacia el lado basolateral (absorción), a través de proteínas tipo Abcc de ubicación apical y basolateral, respectivamente. El intestino de *O. hatcheri* sería más resistente a la toxina en comparación con el de *O. mykiss* debido a que en intestino de *O. hatcheri* no se observó ningún efecto tóxico aún a concentraciones de MCLR más altas que las aplicadas en intestino de *O. mykiss*. Tampoco se observaron efectos tóxicos al bloquear el transporte por proteínas tipo Abcc con MK571. Por el contrario, en intestino de *O. mykiss* se observó inhibición de PP1 y 2A (efecto característico de MCLR) en las concentraciones altas de MCLR o a concentraciones bajas pero en presencia de MK571. La causa de la mayor resistencia observada en *O. hatcheri* aún no está clara y requiere de más estudios.

También se evaluaron los efectos de MCLR sobre la composición de glicoconjugados en el tracto intestinal de *O. hatcheri*. Este estudio se realizó aplicando técnicas de lectina-histoquímica con detección por fluorescencia. Las lectinas utilizadas fueron concanavalina-A, aglutinina de *Dolichos biflorus* y aglutinina de germen de trigo. Los resultados indican que MCLR afecta la abundancia y distribución de los glicoconjugados marcados, según la sección intestinal que se estudie. Estas alteraciones podrían traer consecuencias a nivel de la digestión y/o en las defensas inmunes frente a patógenos y/o podrían ser evidencia de una respuesta defensiva frente a MCLR. Por último, se aplicaron técnicas de inmunohistoquímica para localizar proteínas ABC en el intestino de *O. hatcheri*. Utilizando los anticuerpos para transportadores ABC de mamíferos (anti-ABCB1, ABCC2, ABCC4 y ABCG2) se logró marcar Abcc4 en la membrana basolateral, aunque la marca con este anticuerpo es mucho más fuerte en músculo y Abcg2 se marcó en la región subapical de los enterocitos. No hubo cambios en la localización de la marca de ninguno de estos anticuerpos en respuesta al tratamiento con MCLR.

SUMMARY

CELLULAR TRANSPORT MECHANISMS, ACUMULATION KINETICS AND TOXIC EFFECTS OF MICROCYSTIN-LR IN PATAGONIAN FRESHWATER FISH

Keywords: *Cyanobacteria*; *Microcystin-LR*; *Odontesthes hatcheri*; *Oncorhynchus mykiss*; detoxification; ABC transporters; accumulation; oxidative stress.

This work deals with the accumulation kinetics and toxic effects of the cyanotoxin microcystin-LR (MCLR) as well as with the cellular transport of this toxin in the intestinal epithelium. These studies were performed in two economically and ecologically important freshwater fish species: the Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Both species are potentially exposed to cyanobacteria blooms and to their toxic metabolites in the environment where they live.

The capacity of *O. hatcheri* for digesting cyanobacteria cells and absorbing MCLR was evaluated after the dietary administration of toxic *Microcystis aeruginosa* cells (MCLR producers). In this experiment, a group of fish received crushed *M. aeruginosa* toxic cells, previously disrupted by physicochemical methods (in order to release MCLR) and mixed with commercial fish food. Other group of fish received intact toxic *M. aeruginosa* cells. *O. hatcheri* accumulated MCLR in intestine and liver, in the same proportion in both treatments. This result shows that *O. hatcheri* is able to digest cyanobacteria cell wall and posteriorly absorb the MCLR released in the digestive tract.

In a second experiment, *O. hatcheri* received commercial fish food mixed with crushed *M. aeruginosa* toxic cells (toxic treatment), crushed *M. aeruginosa* non-toxic cells (cyanobacteria control) or just commercial fish food (control). After dietary administration of MCLR, toxic effects and accumulation kinetics were determined in intestine and liver. MCLR treatment represented a sublethal toxin concentration. The biochemical variables measured after intoxication were: protein phosphatase 1 (PP1), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) activities, and lipid peroxidation (as MDA). Methanol-extractable MCLR (native MCLR and MCLR conjugated with GSH or cysteine) was determined by PP1 inhibition assay (PPIA); extractable and protein-bound MCLR were measured by Lemieux oxidation-gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The results obtained showed that MCLR was accumulated in intestine and liver, mostly as MCLR bound to proteins. The MCLR accumulated in both tissues decreased along time until it reached undetectable levels at 48 hours post-intoxication. Only the liver suffered minor toxic effects. These results indicate that *O. hatcheri* is a species that could be affected by cyanobacteria toxic blooms. However, *O. hatcheri* is able to

metabolize and eliminate the accumulated MCLR, at least at the concentration applied in these experiments.

The involvement of membrane proteins of the family Abcc (Mrp) (which are important in the cellular defense against xenobiotics, together with other ABC proteins) in the MCLR transport through the intestinal epithelium was studied in *ex vivo* intestinal preparations. Preparations from both species were incubated with specific Abcc substrates, CDNB and calcein. The specific transport rate of each substrate, applied alone (controls) or in combination with MCLR (treatments) were calculated. These results were compared with those obtained by applying MK571, a specific Abcc inhibitor instead of MCLR. In other set of experiments, MCLR toxic effects (changes in PP1, PP2A and GST activity, GSH concentration) were evaluated in intestinal segments incubated with MCLR alone or combined with MK571. The results of these experiments show that enterocytes of *O. mykiss* and *O. hatcheri* are able to export MCLR both to the intestinal lumen (detoxification) and to the basolateral side (blood), through Abcc-like proteins in the apical and basolateral membrane, respectively. *O. hatcheri*'s intestine seems to be more resistant to MCLR than that of *O. mykiss*, since no toxic effect was observed in *O. hatcheri*, even at higher MCLR concentrations or when Abcc-like transport was blocked with MK571. In contrast, *O. mykiss* suffered PP1 and PP2A inhibition (characteristic toxic effect of MCLR) at the higher MCLR concentration applied or with lower ones combined with MK571. The mechanisms that make *O. hatcheri* intestine resistant to MCLR toxicity are not clear yet and deserve further studies.

Additionally, the effects of MCLR on the glycoconjugates composition of *O. hatcheri*' gastrointestinal tract were studied by lectin histochemistry techniques with fluorescent detection. Lectins used were concanavalin-A, *Dolichos biflorus* agglutinin and wheat germ agglutinin. The results indicate that MCLR affects the amount and distribution of the glycoconjugates marked with the lectins applied. These alterations may affect digestive functions and/or the immune defense system against pathogens. Alternatively, these changes could be the evidence of a defensive response against MCLR. Finally, immunohistochemistry techniques were applied to localize ABC proteins in *O. hatcheri* intestine. Using antibodies against mammalian ABC proteins (anti-ABCB1, ABCC2, ABCC4 and ABCG2), it was possible to localize Abcc4 in the basolateral membrane of enterocytes. However, the reaction with this antibody was stronger in intestinal muscle layers than in the epithelium. Abcg2 was clearly detected in a subapical location in the enterocytes. No changes in localization of these transporters were evidenced as a response to MCLR treatment.

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción	pág.2
<i>Las cianobacterias</i>	3
<i>Floraciones tóxicas de cianobacterias</i>	5
<i>Cianotoxinas</i>	6
<i>Intoxicaciones con cianotoxinas</i>	9
<i>Microcistinas</i>	12
<i>Efectos tóxicos de microcistinas</i>	14
<i>Transporte y metabolismo de microcistina</i>	16
<i>Acumulación de microcistina</i>	18
<i>Los peces dulceacuícolas de la Patagonia y su relación con las cianotoxinas, situación regional</i>	20
<i>La trucha arco-iris y el pejerrey patagónico</i>	21
Objetivo General	27
Hipótesis Generales	27
METODOLOGÍA GENERAL	28
1. <i>Reactivos utilizados</i>	29
2. <i>Individuos de O. mykiss y O. hatcheri</i>	30
3. <i>Cultivos de Microcystis aeruginosa</i>	30
4. <i>Extracción y purificación de MCLR</i>	32
5. <i>Extracto tóxico de MCLR</i>	34
6. <i>Procesamiento de tejidos</i>	36
7. <i>Mediciones bioquímicas (capítulo I y II)</i>	36
7.1. <i>Actividad de PP1</i>	36
7.2. <i>Actividad de PP2A</i>	38
7.3. <i>Actividad Glutación-S-transferasa (GST)</i>	39
7.4. <i>Actividad catalasa (CAT)</i>	39
7.5. <i>Concentración de glutatión reducido (GSH)</i>	40
7.6. <i>Peroxidación lipídica</i>	41
7.7. <i>Determinación de proteínas</i>	42
8. <i>Métodos de detección de microcistina</i>	43
8.1. <i>Ensayo de inhibición de proteína fosfatasa 1 in vitro (PPIA)</i>	45
8.2. <i>Ensayo inmunoenzimático (ELISA)</i>	47
8.3. <i>Cuantificación de MCLR total mediante la detección de MMPB</i>	49
9. <i>Técnicas in vitro para estudio de transporte intestinal (capítulo II)</i>	51
9.1. <i>Sacos y tiras intestinales</i>	52
9.2. <i>Calibración de la técnica de CDNB</i>	54
9.3. <i>Calibración de la técnica de calceína-AM</i>	57
10. <i>Técnicas histológicas y de histoquímica (capítulo III)</i>	58
10.1. <i>Lectina-histoquímica</i>	58

10.2. Inmunohistoquímica.....	59
11. Análisis gráfico y estadístico.....	60
CAPÍTULO I: Efectos tóxicos y acumulación de microcistina-LR en tejidos de	
<i>Odontesthes hatcheri</i>.....	61
Introducción	62
Efectos tóxicos de las microcistinas.....	62
Consumo de cianobacterias y resistencia a cianotoxinas.....	66
Acumulación de microcistina en peces.....	67
Objetivos.....	70
Hipótesis y Predicciones.....	70
Metodología.....	72
Aclimatación de <i>O. hatcheri</i>	72
Extracción de MCLR y preparación del alimento tóxico.....	72
Experimento 1.....	73
Experimento 2.....	74
Análisis estadístico.....	75
Resultados.....	76
Experimento 1.....	76
Experimento 2.....	76
Acumulación de MCLR.....	76
Actividad de PP1 endógena.....	79
Glutación-S-transferasa.....	79
Catalasa.....	80
Peroxidación lipídica.....	81
Discusión.....	82
CAPÍTULO II: Transporte de microcistina-LR a través del intestino en <i>Odontesthes hatcheri</i> y <i>Oncorhynchus mykiss</i>.....	90
Introducción	91
Transporte a través del epitelio intestinal.....	91
Absorción de MCLR.....	92
Mecanismos de detoxificación.....	94
Mecanismos de detoxificación en animales acuáticos.....	98
Detoxificación de MCLR.....	100
Objetivos.....	102
Hipótesis y Predicciones.....	102
Metodología.....	104
Preparaciones intestinales.....	105
Efectos de MCLR en el transporte de DNP-SG.....	105
Efectos de MK571 en el transporte de DNP-SG.....	106
Efectos de MCLR y MK571 en el transporte de calceína.....	107
Efectos tóxicos de MCLR.....	107
Análisis estadístico.....	108

Resultados.....	109
Efectos de MCLR y MK571 en el transporte de DNP-SG.....	109
Transporte calceína en tiras de intestino.....	113
Efectos tóxicos de MCLR.....	114
Discusión.....	117
CAPÍTULO III: Efectos de MCLR en la composición de glicoconjugados y en la localización de proteínas tipo ABC en intestino de <i>Odontesthes hatcheri</i>.....	125
Introducción	126
Características anatómicas e histológicas del sistema digestivo de <i>O. hatcheri</i>	126
Efectos tóxicos de MCLR en el epitelio intestinal.....	128
Transportadores ABC en peces.....	130
Objetivos.....	132
Hipótesis y Predicciones.....	132
Metodología.....	133
Exposición de <i>O. hatcheri</i> a MCLR.....	133
Histología.....	133
Lectina-histoquímica.....	134
Inmunohistoquímica.....	135
Resultados.....	137
Lectina-histoquímica.....	137
Inmunohistoquímica.....	145
Discusión.....	151
CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES.....	157
Conclusiones.....	169
BIBLIOGRAFÍA.....	170
Anexo I.....	196
Anexo II.....	197
Anexo III.....	198
TRABAJOS DE RESPALDO.....	204

INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCIÓN

En numerosos lagos, ríos y estuarios es común encontrar microorganismos que alcanzan densidades exuberantes bajo determinadas condiciones ambientales, al menos en algún momento del año. Estos aumentos masivos de densidad en corto tiempo, que reciben el nombre genérico de floraciones algales, son eventos naturales producidos generalmente por algún componente del fitoplancton que se vuelve dominante (especies de microalgas, dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias, entre otros). La mayoría de las floraciones no producen problemas a otros seres vivos, por el contrario, aumentan la disponibilidad del alimento natural de bivalvos, crustáceos y peces fitoplanctófagos, y resultan beneficiosas para la acuicultura y la producción de recursos marinos (Suárez Isla y Guzmán Méndez, 1999). Sin embargo, en otros casos, el desarrollo excesivo de microorganismos conlleva importantes cambios fisicoquímicos en el ambiente acuático, convirtiéndolo en una región adversa para la vida, además de que algunas floraciones son acompañadas por la producción de biotoxinas, con consecuencias tóxicas para los organismos acuáticos, la salud humana, la acuicultura y el turismo (Backer, 2002). A estas floraciones tóxicas se las denomina floraciones algales nocivas (FAN) y comúnmente reciben el nombre de “mareas rojas”, cuando ocurren en medio marino. La denominación de mareas rojas se debe a que generalmente van acompañadas del cambio en la coloración del agua, producto de los pigmentos fotosintéticos de los microorganismos, aunque no siempre es así.

Las FAN son causadas por un grupo poco numeroso de especies de microalgas (se ha observado la participación de sólo unas 60 especies de alrededor de las 4000 conocidas) (Suárez Isla y Guzmán Méndez, 1999). Entre los principales organismos causantes se encuentran dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias. En términos de salud humana, se ha descrito que las mareas rojas pueden producir neurotoxinas con efectos paralizantes y amnésicos (saxitoxinas y ácido

domoico) y toxinas de efectos gastrointestinales (ácido okadaico), entre otras toxinas. Actualmente se sabe que muchas especies causantes de FAN no son tóxicas para los humanos o mamíferos pero sí lo son para organismos acuáticos. A su vez, sólo se conocen los mecanismos de toxicidad de unos pocos entre la gran variedad de compuestos producidos en las FAN (Landsberg, 2002).

Dentro de las FAN, las floraciones de cianobacterias son de las más importantes a nivel mundial, en cuanto a la salud pública y ambiental (Backer, 2002). Los distintos grupos de peces, al igual que otros organismos acuáticos, evolucionaron en ambientes donde podían estar presentes las cianobacterias y los metabolitos tóxicos que éstas pueden producir (cianotoxinas). Por esto, surgen interrogantes sobre el peligro que representan las cianotoxinas sobre los peces. Al estar expuestos de manera natural, por ejemplo, a través del consumo directo de cianobacterias en la dieta, resulta interesante determinar si las cianotoxinas pueden afectar aspectos fisiológicos de los individuos, si estos compuestos se acumulan en los tejidos y a lo largo de la cadena trófica o si, por el contrario, los peces poseen mecanismos de defensa que les permiten tolerar y/o eliminar estos compuestos. Teniendo en cuenta el riesgo potencial que representan las FAN de cianobacterias, tanto para la salud humana como para los ambientes acuáticos, en esta tesis se propuso estudiar la acumulación y los procesos fisiológicos involucrados en el transporte a través de la membrana plasmática de una cianotoxina representativa, microcistina-LR (MCLR), en peces patagónicos.

Las cianobacterias

Son los microorganismos aeróbicos fotoautótrofos más antiguos del planeta, con su origen estimado hace aproximadamente unos 2700 millones de años (Bonilla y Aubriot, 2009). Pertenecen al dominio Bacteria (eubacterias), y son consideradas un componente principal en la producción primaria de materia orgánica. Estos microorganismos fueron los primeros en liberar oxígeno molecular,

por lo que tuvieron un papel importante en la formación de la atmósfera primitiva (Mur et al., 1999; Badger y Price, 2003).

Las cianobacterias constituyen un grupo muy particular debido a que poseen características estructurales de bacterias y características funcionales de eucariotas fotosintéticos. Su semejanza con las demás bacterias se debe a que no poseen membrana nuclear ni otras organelas de membrana, la pared celular está compuesta por peptidoglicano (relativamente similar a la pared de las bacterias Gram negativas) y sus ribosomas sedimentan a 70S, a diferencia de los de eucariotas, que sedimentan a 80S. Por otro lado, a diferencia de cualquier otro procariota, son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, poseen tilacoides con maquinaria fotosintética, que incluye pigmentos como clorofila a (y en algunos grupos clorofila b), pigmentos accesorios y protectores, como ficobilinas (responsables del característico color verde-azul) y carotenos (Mur et al., 1999; Bonilla y Aubriot, 2009).

Las cianobacterias conforman un grupo muy diverso en cuanto a tipos celulares, que comprende especies unicelulares, coloniales o filamentosas, en algunos casos llegando a formar colonias visibles (Mur et al., 1999; Osswald et al., 2007). La mayoría son de vida libre, comunes en ambientes acuáticos de agua dulce, salobre o marina, mientras que otras son terrestres y existen algunas especies parásitas.

En general, poseen una serie de características que les permiten ser dominantes frente a otros microorganismos en un ambiente acuático. De acuerdo a varios trabajos (Mur et al., 1999; Engström-Öst, 2002; Osswald et al., 2007; Smith et al., 2008), el éxito competitivo de este grupo puede ser atribuido a que:

- ✓ Las especies de cianobacterias planctónicas son capaces de regular su posición en la columna de agua mediante vesículas de gas, lo cual les permite aprovechar y controlar la cantidad de luz necesaria para la fotosíntesis.
- ✓ Son capaces de sobrevivir y crecer bajo un amplio espectro de temperaturas (se encuentran, por ejemplo, en aguas termales y en lagos polares) y en un amplio

intervalo salino (desde aguas dulces oligotróficas a estuarios, aguas marinas y lagunas hipersalinas).

- ✓ Pueden crecer en ambientes pobres en nutrientes y algunas especies son capaces de acumular algunos de ellos, por ejemplo fósforo, y de fijar nitrógeno atmosférico (Ordenes Nostocales y Stigonematales).
- ✓ Pueden absorber bicarbonato además de CO₂ para la fotosíntesis.
- ✓ Son resistentes a la depredación gracias a que algunas especies producen compuestos tóxicos, que dificultan su consumo por invertebrados planctónicos y por vertebrados. En comparación con otros componentes del fitoplancton, las cianobacterias son reconocidas por algunos organismos filtradores como “pobres nutricionalmente”.

Floraciones tóxicas de cianobacterias

Se habla de “floración de cianobacterias” cuando las mismas son los organismos que se convierten en dominantes (Chorus y Bartram, 1999; Roset et al., 2001). La aparición de estos microorganismos es ubicua y a nivel mundial se han registrado casos de crecimientos masivos de cianobacterias, ya sea estacionalmente o presentes todo el año (Vasconcelos et al., 1996; Chorus y Bartram, 1999; Dörr et al., 2010). Es importante resaltar que, aunque las floraciones de cianobacterias y en general las FAN son procesos naturales del medio acuático, la eutrofización derivada del impacto del hombre ha incrementado la aparición de las mismas en numerosos cuerpos de agua (McGowan et al. 1999). En el caso particular de las floraciones de cianobacterias, estas no están estrictamente relacionadas con la eutrofización sino que responden a diversos factores como la temperatura y consecuencias asociadas (estratificación térmica, cambios en la profundidad de la zona de mezcla, etc.) (Bonilla y Aubriot, 2009).

Además de producir los efectos nocivos típicos de las floraciones, como cambios fisicoquímicos y bloqueo del paso de luz hacia las capas más profundas de la columna de agua, que afecta el desarrollo de otros autótrofos; el mayor interés

por las FAN de cianobacterias radica en la capacidad de estos organismos de producir compuestos tóxicos para otros seres vivos, las cianotoxinas, y porque suelen afectar cuerpos de agua utilizados por el hombre, provocando grandes impactos sanitarios y económicos (Osswald et al., 2007; Havens, 2008).

Cianotoxinas

Son metabolitos secundarios que se producen durante la formación de los fotopigmentos. Se ha visto que la producción de cianotoxinas es máxima cuando las condiciones de crecimiento para las cianobacterias son óptimas, es decir, durante una floración. Por este motivo, se observa una producción de cianotoxinas directamente proporcional al aumento de la biomasa (Chorus y Bartram, 1999; Sivonen y Jones, 1999; Codd et al., 2005b). Las cianotoxinas son compuestos intracelulares pero cuando las células mueren (por ejemplo durante una floración senescente), se liberan grandes cantidades de las mismas al agua (Sivonen y Jones, 1999), con el consecuente peligro para los organismos que habitan en el ambiente y/o consumen el agua (Carmichael, 1992; Kuiper-Goodman et al., 1999; Ibelings y Chorus, 2007).

Las cianotoxinas conforman un grupo muy diverso desde el punto de vista de su estructura química y por los efectos tóxicos que producen, y se clasifican según las características que se detallan en la Tabla1.

EFEECTO TÓXICO	CIANOTOXINA	ESTRUCTURA	CARACTERÍSTICAS
Hepatotoxinas	<i>Microcistinas (MC)</i>	Péptidos Cíclicos	Inhíben actividad de enzimas PP1- 2A Producidas por: <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Dolichospermum (Anabaena)</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanocapsa</i> .
	<i>Nodularinas (ND)</i>		ND producidas por <i>Nodularia spp.</i>
	<i>Cilindrospermop- sina</i>		Inhíbe síntesis proteica. Producida por <i>Dolichospermum</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Raphidiopsis</i> .
Neurotoxinas	<i>Saxitoxinas y neosaxitoxinas</i>	Alcaloides	Inhíben la transmisión nerviosa por bloqueo de canales de sodio, induciendo parálisis muscular. Producidas por <i>Dolichospermum</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Lyngbya</i> .
	<i>Anatoxina-a y toxinas relacionadas</i>		Interfieren transmisión de impulsos ner- viosos en sinapsis químicas de vertebra- dos. Bloquean receptores colinérgicos ni- cotínicos neuro-musculares. Mimetizan la acción del neurotransmisor acetilcolina. Producidas por <i>Planktothrix</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Dolichospermum</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Raphidiopsis</i> .
	<i>Anatoxina-a(s)</i>	Organo- fosforado	Inhíbe la actividad de la enzima acetilco- linesterasa. Es más tóxica que anatoxina- a. Producida por <i>Dolichospermum spp.</i>
	<i>β-metil amino alanina (BMAA)</i>	Aminoácido no proteico	Producido por gran variedad de ciano- bacterias. Considerado agente causal de trastornos degenerativos en seres huma- nos, incluyendo el síndrome complejo Parkinson-ELA-demencia (ELA-PD).
Dermatotoxinas	<i>Lipopolisacáridos (LPS)</i>	Polímeros complejos	Producen efectos gastrointestinales, alergias e irritaciones en la piel.
	<i>Aplisiatoxinas y lyngbyatoxina</i>	Alcaloides	Promueven tumores, activadores de PKC. Producidas por <i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> y <i>Oscillatoria</i> y especies bentónicas marinas, en particular <i>Lyngbya majuscula</i>
Bactericinas	<i>Microcinas</i>	Péptidos	Inhíben crecimiento de bacterias al alterar funciones esenciales como la replicación del ADN, transcripción y traducción. Producidas por cianobacterias marinas del género <i>Synechococcus</i> .
	<i>Prochlorosinas</i>		Función desconocida. Producidas por especies marinas, <i>Prochlorococcus spp.</i>

Tabla 1. Cianotoxinas clasificadas según sus efectos tóxicos y estructura química. Información compilada de Siivonen y Jones, 1999; Carmichael, 2001; Kaebnick y Neilan, 2001; Pflugmacher et al., 2001; Wiegand et al., 2002; Codd et al., 2005b; Wiegand y Pflugmacher, 2005; Komárek y Zapomělová, 2007; Osswald et al., 2007; Brena y Bonilla, 2009; Wacklin et al., 2009; Ardanaz, 2010; Paz-Yepes et al., 2013, Toporowska y Pawlik-Skowrońska, 2014.

Se ha observado que no todas las cianobacterias son capaces de producir toxinas, incluso entre cepas de una misma especie algunas son productoras de compuestos tóxicos y otras no (Sivonen y Jones, 1999). También se ha descrito que, en algunos casos, situaciones de estrés estimularían la producción de estos compuestos (Ross et al., 2006). Sin embargo, se desconoce aún cuál es la función fisiológica que cumplen. Algunos autores sugieren que las cianotoxinas:

- ✓ cumplirían un papel protector frente a depredadores (“repelente frente a pastoreadores”) (Carmichael et al., 1992; Kaebernick and Neilan, 2001; Engström-Öst, 2002; Wiegand and Pflugmacher, 2005).
- ✓ representarían una ventaja ecológica para dominar en la estructura poblacional de un ambiente frente a algas y plantas superiores (Wiegand and Pflugmacher, 2005).
- ✓ servirían para establecer relaciones tróficas con otras cianobacterias y organismos. Es decir serían compuestos aleloquímicos, útiles para suprimir o estimular el crecimiento de otras especies de fitoplancton y por lo tanto cumplirían un papel primordial en la competencia del sistema pelágico (Kaebernick and Neilan, 2001; Engström-Öst, 2002; Pflugmacher, 2002; Wiegand and Pflugmacher, 2005).
- ✓ funcionarían como fuentes de reserva de nitrógeno (Engström-Öst, 2002).
- ✓ En el caso de las MC, recientemente se ha propuesto que podrían cumplir un papel modulador de proteínas y de protección antioxidante (Zilliges et al., 2011).

Mientras que otros trabajos proponen que las cianotoxinas son metabolitos secundarios sin función específica conocida (Engström-Öst, 2002; Babica et al. 2006).

Intoxicaciones con cianotoxinas

Las concentraciones tóxicas registradas en floraciones pueden ser muy variables, abarcando desde valores traza a más de 1800 $\mu\text{g L}^{-1}$ de toxina disuelta en el agua (Chorus y Bartram, 1999). Por masa de tejido seco (mts) de plancton, las mayores concentraciones tóxicas registradas en floraciones de cianobacterias han superado los 7000 $\mu\text{g g}^{-1}$ mts para MC (Sivonen y Jones, 1999). Las MC son las toxinas que con mayor frecuencia se han asociado a casos de intoxicación y mortandad (Sivonen y Jones, 1999; Dietrich y Hoeger, 2005; Dörr et al., 2010).

Desde 1878, fecha en que se registró la primera mortandad de ganado vacuno en Australia causada por la ingestión de agua con cianobacterias tóxicas; hasta la actualidad, se han registrado numerosos casos de intoxicación de animales de granja, silvestres e incluso de humanos, en todo el mundo, como consecuencia del consumo de agua o animales expuestos a floraciones de cianobacterias tóxicas (Sivonen and Jones, 1999; Backer, 2002; Landsberg, 2002). En humanos, se han presentado casos de intoxicación por consumo de agua o animales contaminados y por exposición a cuerpos de agua con presencia de cianobacterias; sin embargo, los casos de mortalidad por cianotoxinas son raros. El primer caso confirmado de mortalidad humana producido por MC se registró en 1996 en una clínica de Caruaru, Brasil, cuando pacientes con enfermedad renal crónica recibieron agua contaminada con la toxina en sus sesiones de diálisis (Carmichael et al., 2001; Azevedo et al., 2002). Existen informes de casos previos de intoxicación donde se sospecha de la presencia de cianotoxinas involucradas, aunque la falta de información y técnicas de detección adecuadas en su momento, no permitieron la identificación de las toxinas (Carmichael et al., 2001).

En Sudamérica, muchas ciudades utilizan represas superficiales para extraer agua de consumo. En muchos casos, estas fuentes de agua están expuestas a la acción antrópica y tienden a desarrollar floraciones de cianobacterias. *Microcystis* y *Dolichospermum* (*Anabaena*), son los géneros que predominan en las floraciones tóxicas descritas en Sudamérica (de León y Yunes, 2001; Azevedo et al., 2002;

Magalhães et al., 2003; Soares et al., 2004; Codd et al., 2005a; Echenique et al., 2008; Ardanaz, 2010; Dörr et al., 2010).

En Argentina, se han observado floraciones de cianobacterias tóxicas desde 1944, cuando en la laguna Bedetti (Santo Tomé, Santa Fe) murieron animales de granja y silvestres tras la ingesta de agua en la que se desarrollaban especies de *Anabaena* (actualmente *Dolichospermum*) (Mullor, 1945: En Carvajal, 2011). Posteriormente, Ringuelet et al. (1955) describieron la mortandad de peces debida a la presencia de *Anabaena* y *Polycystis* (actualmente *Microcystis*) spp. tóxicas en la laguna del Monte, Provincia de Buenos Aires. En las décadas de los '80 y '90, los casos de intoxicaciones por cianobacterias se incrementaron notablemente en Argentina, registrándose floraciones de cianobacterias toxígenas, principalmente de las especies *Microcystis aeruginosa* y *Dolichospermum spiroides* y *circinalis*, en distintos sistemas fluviales del país (Río de la Plata, río Uruguay, embalse de Salto Grande, río Paraná, embalse de Yacyretá, en embalses de la región semiárida de Córdoba y en diversos ambientes del Chaco, entre otros) (Ardanaz, 2010; Ruiz et al., 2010; Rosso et al., 2014). En las aguas costeras del estuario del Río de la Plata, Giannuzzi et al. (2012) describieron que durante los años 2004-2007, *Microcystis aeruginosa* dominó ampliamente en el fitoplancton y se detectaron concentraciones de 0,02 a 8,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de microcistina-LR (MCLR) en el agua durante floraciones tóxicas. Un caso de intoxicación fue registrado en Salto Grande, Entre Ríos, donde un hombre, al practicar actividades acuáticas deportivas, cayó sobre una floración de *Microcystis* spp. (donde luego se comprobó que había una concentración de 48,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MCLR en agua). Este hombre sufrió una intoxicación aguda con diversos síntomas gastrointestinales, hepáticos y pulmonares, entre otros, que lo llevaron a internación, y demoró 20 días en recuperarse (Giannuzzi et al., 2011).

Mientras a nivel mundial y regional se incrementaban los casos descriptos de floraciones de cianobacterias tóxicas, se fueron especializando distintos centros de investigación sobre cianobacterias y sus toxinas (Carvajal, 2011). En este aspecto se destaca la creación de la red global "CYANONET", en 2004, en el marco del

Programa de Hidrología Internacional (Codd et al., 2005a). Esta red tiene como objetivo nuclear los antecedentes sobre intoxicaciones y evaluar los posibles planes de manejo frente a floraciones de cianobacterias tóxicas. Dentro de la recopilación de información de CYANONET, se incluyeron los antecedentes de la Argentina, permitiendo que se estableciera el estado de la problemática en el país (Codd et al., 2005a; Carvajal, 2011). A nivel regional, se creó la RED CYANOSUR, en 2004, conformada por científicos de diferentes instituciones públicas y privadas ante la preocupante proliferación de floraciones algales en diferentes cuerpos de agua de la Argentina.

En la Cuenca del Río Negro, históricamente se ha documentado la ocurrencia de floraciones, que se producen habitualmente en los embalses Ramos Mexía y Arroyito, trasladando sus efectos aguas abajo por los ríos Limay y Negro. Por lo que en esta región, la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro (AIC) han establecido estrategias de monitoreo de floraciones, en el marco de la Unión de Gestión de Calidad del Agua, implementada en 1995, en conjunto con otros organismos competentes en materia de agua de las provincias de Río Negro y Neuquén. En los monitoreos realizados entre 2005 y 2010, se encontró que las cianobacterias representaban cerca del 5-8% de la riqueza específica del fitoplancton en la región del río Limay, en el embalse Mari Menuco y en la desembocadura del río Negro, con periodos puntuales del año donde se observaron floraciones (octubre-marzo), principalmente del género *Dolichospermum* (*D. circinalis*, *D. spiroides* y *D. lemmermanni*). Sin embargo, a pesar de haberse detectado floraciones de cianobacterias, éstas no ocasionaron problemas para la potabilización del agua y no se informaron floraciones potencialmente tóxicas, aunque en dichos informes no se presentan resultados de mediciones de toxinas o de toxicidad (Othaz Brida et al., 2010).

Microcistinas

Las MC están entre las cianotoxinas más potentes y frecuentes en ambientes acuáticos (Dietrich y Hoeger, 2005). Esto ha llevado a que sean también las cianotoxinas más estudiadas. En particular para nuestro país, las MC tienen la mayor relevancia dentro de las cianotoxinas debido a que han sido detectadas en aguas de consumo domiciliario y recreacionales en diferentes oportunidades (Echenique, 2008; Carvajal, 2011; Pose et al., 2008).

Históricamente, el primer antecedente sobre estas hepatotoxinas data de 1959, cuando Bishop et al. (1959) aislaron este tipo de toxina de una cepa de *Microcystis aeruginosa*. Posteriormente, en 1965 estas toxinas recibieron el nombre de “microcistinas” (MC) por Konst et al. (1965) y Carmichael et al. (1988). Entre las cerca de 70 variantes descritas, microcistina-LR (MCLR) es una de las más tóxicas y la más común en cuerpos de agua dulce y salobre de todo el mundo (Chorus y Bartram, 1999; Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011).

La fórmula general de las MC consta de 7 aminoácidos con la siguiente estructura: ciclo-(D-alanina¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-glutamato⁶-Mdha⁷), donde X y Z son L-aminoácidos variables y D-MeAsp es ácido D-eritro-metilaspártico. Esta toxina tiene 2 aminoácidos: N-metildehidroalanina (Mdha) y ácido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico (Adda), que no se conocen en otros organismos (Carmichael, 1992). En la figura 1 se muestra la estructura de MCLR, que se caracteriza por tener Leucina y Arginina en las posiciones variables (X y Z respectivamente).

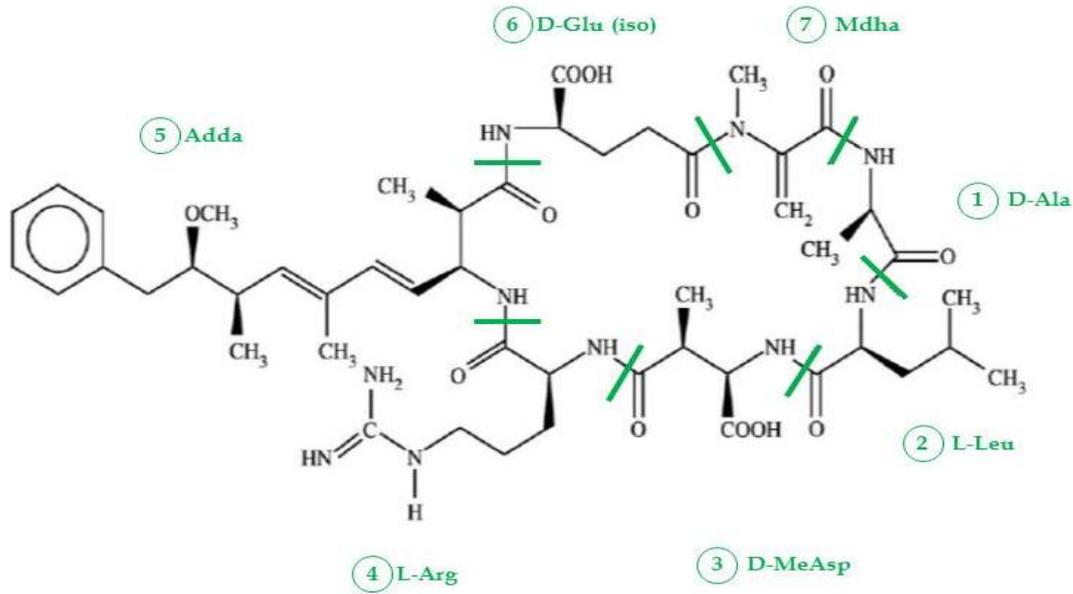


Figura 1. Estructura molecular de MCLR (modificado de Wiegand y Pflugmacher, 2005).

Las MC son péptidos no ribosomales, sintetizados por un complejo multifuncional de proteínas presente sólo en procariotas y en algunos eucariotas. Esta toxina se puede encontrar en todo el interior celular aunque se acumularía principalmente en tilacoides, nucleoplasma y cuerpos pirofosfato. La ubicación preferencial en estas estructuras sugiere que las MC jugarían un papel importante en la captación de luz y en respuestas de adaptación (revisión de Campos y Vasconcelos, 2010).

Las MC son moléculas muy estables y persistentes en un cuerpo de agua debido a su estructura cíclica. En ambientes acuáticos, en condiciones de oscuridad, pueden persistir incluso durante meses o años (Sivonen y Jones, 1999). Estas toxinas son relativamente polares y tienden a ser neutras o aniónicas, según el pH del medio, debido a los grupos ionizables que poseen, como los ácidos carboxílicos y a la presencia frecuente de arginina en las posiciones de aminoácidos variables. Esto hace que mayoritariamente se disuelvan en el agua una vez liberadas, en vez de encontrarse adsorbidas en el sedimento. Por ejemplo, la solubilidad de MCLR es mayor que 1 g L^{-1} . De todos modos la estructura general de MC tiene partes hidrofóbicas, como el residuo Adda y, según los aminoácidos

que tengan en las posiciones variables, algunas variantes pueden ser relativamente lipofílicas (Rivasseau et al., 1998).

La estabilidad química de las MC las convierte en difíciles de degradar en el laboratorio. Son muy resistentes a la hidrólisis química y a la oxidación a pH neutro y pueden permanecer estables incluso luego de la ebullición. Los métodos utilizados para su degradación son oxidaciones fuertes, que pueden llevarse a cabo por ozono, luz UV o con oxidantes químicos fuertes como permanganatos de sodio y potasio (Harada et al., 1996; Sivonen y Jones, 1999). Por otro lado, en la naturaleza, factores como biodegradación y fotólisis pueden disminuir las concentraciones de MC en el ambiente.

Efectos tóxicos de microcistinas

La mayoría de los trabajos de toxicidad de MCLR, *in vivo* e *in vitro*, se han llevado a cabo en mamíferos (ratas y ratones) y en hepatocitos primarios aislados y líneas celulares de humanos (Eriksson et al., 1990; Runnegar et al., 1995; Ding et al., 2001). La concentración letal 50 (CL₅₀) para ratones, cuando la toxina se administra por vía intraperitoneal, es de 0,025 a 0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ masa corporal (mc), mientras que la CL₅₀ para ratones alimentados forzosamente con MCLR es de 5 -11 $\mu\text{g g}^{-1}$ mc (Kondo et al., 1992; Dawson, 1998; Kuiper-Goodman et al., 1999).

Las MC afectan principalmente al hígado, aunque también afectan al riñón y a otros órganos. El efecto nocivo característico de estas toxinas es una fuerte inhibición de proteínas fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A), tanto *in vitro* (Eriksson et al., 1990; Honkanen et al., 1990; MacKintosh et al., 1990, 1995) como *in vivo* (Runnegar et al., 1993). También se ha visto que inhiben otras fosfatasas como PP3-PP6 mientras que PP2B, PP2C y PP7 no serían afectadas por estas toxinas (Honkanen et al., 1994; Toivola et al., 1997). Las PP son una familia de enzimas relacionadas, que remueven grupos fosfato de residuos serina, treonina e histidina de otras proteínas y su función es clave en la regulación de numerosos procesos biológicos. La función de estas proteínas es vital y se ha observado que la

estructura de las mismas se encuentra muy conservada en todos los eucariotas. Parecería, a su vez, que estas características convierten a las PP en blancos de varias toxinas (MacKintosh et al., 1995). Se ha descrito que la concentración de MCLR, que inhibe en un 50% (CI₅₀) la actividad de la enzima PP1 *in vitro*, es similar entre especies de distintos grupos (entre 0,1-0,25 nM), incluyendo mamíferos, bivalvos, zooplancton y plantas (revisión de Wiegand y Pflugmacher, 2005).

La inhibición de las PP lleva a un desbalance en la regulación por fosforilación de las proteínas celulares y a la pérdida de la integridad del citoesqueleto, hecho que ha sido relacionado con los efectos citotóxicos de MCLR, con procesos apoptóticos y con la promoción de tumores (Carmichael, 1994; MacKintosh et al., 1995; Dawson, 1998; Hooser, 2000; Campos y Vasconcelos, 2010). Además, esta toxina induce efectos tóxicos por otros mecanismos, como estrés oxidativo (Amado y Monserrat, 2010).

Las FAN de cianobacterias ocurren mayoritariamente en cuerpos de agua dulce, aunque se han descrito algunos casos de intoxicación con MC en ambientes marinos. Un caso particular es el de los salmones del Atlántico (*Salmo salar*), criados en las costas de Canadá y Estados Unidos. Se han registrado casos importantes de intoxicación por MC, relacionados con una enfermedad que recibió el nombre de “*Net Pen Liver Disease*” (Andersen et al., 1993; Williams et al., 1995), caracterizada por la progresiva degeneración hepática, con la consecuente mortandad de peces y grandes pérdidas económicas. En estos trabajos, se sugiere que la fuente de intoxicación serían larvas de cangrejo, que se alimentarían de cianobacterias tóxicas de ambientes de agua dulce o salobre, que luego llegarían al mar y serían consumidas por los salmones (Kent et al., 1990; Williams et al., 1997a).

Numerosos trabajos describen efectos tóxicos causados por MC en distintos grupos taxonómicos tales como bivalvos, crustáceos, plantas, algas, bacterias,

moluscos y peces (Chorus y Bartram, 1999; Wiegand y Pflugmacher, 2005; Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011; Zanchett y Oliveira-Filho, 2013). En el caso de los peces, se han registrado efectos tóxicos en varias especies dentro de los salmoniformes, siluriformes, cipriniformes y perciformes (Tencalla y Dietrich, 1997; Sivonen y Jones, 1999; Malbrouck y Kestemont, 2006). Por otro lado, los resultados de trabajos tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que los peces son menos sensibles a MCLR que los mamíferos, sin embargo, las causas de esta diferencia aún no se conocen. La CL_{50} intraperitoneal para los peces es aproximadamente 10 veces más alta que la CL_{50} descripta para ratones y ratas (Råbergh et al., 1991; Tencalla et al., 1994; Kotak et al., 1996; Bury et al., 1998; Kuiper-Goodman et al., 1999). A su vez, se ha descrito que la sensibilidad a MCLR varía entre distintas especies de peces y entre estadios de desarrollo dentro de una misma especie, resultando los primeros estadios de vida más sensibles que los adultos (revisiones de Malbrouck y Kestemont, 2006; Zanchett y Oliveira-Filho, 2013)

Transporte y metabolismo de microcistina

Debido a las discrepancias observadas entre los efectos de las MC *in vitro* sobre las PP y los efectos de toxicidad aguda observados *in vivo*, para algunos autores, la toxicidad de las MC es el resultado de la toxicocinética (absorción, distribución y excreción) más que de la toxicodinámica (*e.g.* inhibición de las PP) (Fischer y Dietrich, 2000; Ito et al., 2002). Las MC (al menos MCLR y otras formas relativamente polares) son moléculas que, por su tamaño y polaridad, no pueden atravesar las membranas celulares y, por lo tanto, no penetrarían a través de cualquier epitelio. Varios estudios sostienen que MCLR es absorbida principalmente por vía gastrointestinal, a través de transportadores del sistema biliar, denominados Oatp (polipéptidos transportadores de aniones orgánicos) (Fischer et al., 2005; Boaru et al., 2006; Feurstein et al., 2010).

Una vez en el interior de la célula, MCLR es conjugada con glutatión reducido (GSH) mediante una reacción de fase II de biotransformación, catalizada

por la enzima glutatión S- transferasa (GST) (Kondo et al., 1992, 1996; Pflugmacher et al., 1998; Takenaka, 2001). Este mecanismo de defensa ha sido descrito tanto en vertebrados (Kondo, et al., 1996; Pflugmacher et al., 1998; Wiegand et al., 1999; Ito et al., 2002) como en invertebrados (Pflugmacher et al., 1998; Beattie et al., 2003; Zhang et al., 2009). Tanto el conjugado de MCLR con GSH (MC-SG) como los productos de la unión covalente de MCLR con proteínas (*e.g.* PP) pueden ser subsecuentemente degradados a MCLR unida a cisteína (MC-Cis), por lo tanto, luego de la intoxicación, en las células puede encontrarse MCLR unida a proteínas, conjugada MC-SG o MC-Cis y también en su forma nativa. Los conjugados MC-SG y MC-Cis son menos tóxicos que la MC nativa. Los valores de CL_{50} para los conjugados MC-Cis y MC-SG, en ratones intoxicados por vía intraperitoneal, son 0,3 y 0,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, mientras que la CL_{50} de la MCLR nativa es de 0,025 a 0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$. Se ha descrito, además, que estos conjugados inhiben la actividad de PP pero en menor grado que la forma nativa (Kondo et al., 1992; Ito et al., 2002). Ito et al., (2002) compararon los parámetros cinéticos de la inhibición de PP por MCLR, MCRR (variante menos tóxica) y de los conjugados de MCLR, MC-SG y MC-Cis, en ratones intoxicados mediante inyección intratraqueal y observaron que las diferencias en CL_{50} entre estos compuestos no son completamente explicadas por diferencias en la capacidad de inhibir las PP, debido a que todos estos compuestos tienen afinidades altas y similares por las PP. Los autores sugieren que las diferencias de toxicidad entre MCLR, MCRR, MC-Cis y MC-SG podrían deberse a la eliminación efectiva de MCRR (variante de MC más hidrofílica que LR) y de los conjugados de MCLR con respecto a MCLR nativa. Es decir que la toxicidad dependería de la biodisponibilidad. En el mismo trabajo, los autores estudiaron la distribución de estos compuestos mediante técnicas de inmunohistoquímica y, según sus resultados, cada órgano de excreción tuvo un comportamiento característico: MC-Cis sería efectivamente excretada por riñón, mientras que MCRR sería eliminada principalmente por intestino. MC-SG mostró una distribución intermedia entre estos dos órganos. El hígado, extrañamente, no

mostró un papel significativo en la eliminación de dichos conjugados aunque sí se observó acumulación de MCLR. Por otro lado, Sahin et al. (1996) detectaron eliminación de MCLR o sus metabolitos a través de la secreción biliar, en trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) luego de la intoxicación por vía oral con células de *M. aeruginosa*.

En cuanto a cuáles serían los transportadores implicados en la detoxificación y/o absorción hacia la sangre de MC, son pocos los trabajos que existen al respecto. Dentro de las cianotoxinas, MCLR es la única sobre la cual existe alguna información sobre transporte celular, aunque muy escasa. En estos estudios se menciona la posible implicancia de transportadores de la superfamilia ABC en la eliminación de MCLR conjugada con GSH. Ito et al. (2002) y Malbrouck y Kestemont (2006) sugirieron que el conjugado MC-SG podría ser transportado a través de transportadores ATP-dependientes, que exportan conjugados de glutatión, mientras que Contardo-Jara et al. (2008) y Amé et al. (2009) sugieren la participación de otro transportador, ABCB1 (Pgp), en dicho proceso.

Acumulación de microcistina

Considerando que son más comunes las intoxicaciones crónicas que las agudas con MC (Magalhães et al., 2003) y que las exposiciones prolongadas o frecuentes, aún a bajas concentraciones de MC, pueden producir efectos tóxicos, distintos países han establecido límites de referencia de concentración de MC en aguas y alimentos, con el fin de minimizar el riesgo para la salud. La Organización Mundial para la salud (OMS) estableció como valor de referencia para agua de consumo un máximo tolerable de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de MCLR y determinó que la ingesta diaria tolerable (IDT) no debería superar los $0,04 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Este último valor es calculado en base al “Nivel de Efectos Adversos No Observables” (sigla en inglés, NOAEL) para una persona de 60 kg, que consume 2 L de agua por día, que se expone en un 80% a las MC a través del consumo de agua y otro 20% a otras fuentes de intoxicación como alimentos de origen acuático (Kuiper-Goodman et al.,

1999; Sivonen y Jones, 1999; Ibelings y Chorus, 2007; Carvajal, 2011). La IDT, es la cantidad de una sustancia potencialmente peligrosa que puede ser consumida diariamente a lo largo de la vida sin que sea un riesgo para la salud (Kuiper-Goodman et al., 1999). Sin embargo, diversos estudios muestran que esos valores de referencia de consumo a veces son largamente superados (Ibelings y Chorus, 2007), debido a floraciones de cianobacterias en ambientes acuáticos donde se encuentran las tomas de agua potable, a recreación en ambientes contaminados, al consumo de organismos intoxicados o a la suma de todas estas fuentes de intoxicación. En la actualidad, se considera que hacen falta más estudios para establecer un valor guía y algunos países proponen un valor de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de MCLR en vez del valor propuesto por la OMS, mientras que, si se consideran los posibles efectos cancerígenos de estas toxinas, las MC deberían estar completamente ausentes en el agua potable (Carvajal 2011; Pflugmacher com. pers.).

En los organismos acuáticos, la exposición a MC a través del alimento parece ser la vía más importante (Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011). Aquellos organismos que no se alimentan directamente de cianobacterias, estarían expuestos a la MC acumulada a través de la cadena trófica. De esta forma puede llegar una gran concentración de toxina a los alimentos de consumo humano (Sivonen y Jones, 1999). Ocurre “bioacumulación” de MC cuando la concentración de estos compuestos en tejidos de un organismo excede a la concentración presente en el ambiente, debido a la captación a través de todas las fuentes de exposición (Dionisio Pires et al., 2004; Ibelings y Chorus, 2007). Cuando la exposición se restringe sólo al consumo directo de agua (con toxinas disueltas), el proceso se denomina “bioconcentración” y el resultado también es una mayor concentración de toxina en el organismo que en el ambiente. Por otro lado, se denomina “biomagnificación” a la transferencia del compuesto químico desde el alimento al organismo, resultando en una mayor concentración del compuesto en el organismo respecto del alimento consumido y que se transfiere a lo largo de la cadena trófica. También puede ocurrir “biodilución” a lo largo de la cadena trófica, cuando los

procesos de detoxificación de los organismos hacen que la concentración del compuesto disminuya.

La acumulación de MC ha sido descrita en numerosos organismos tales como zooplancton (Mohamed, 2001; Ferrão-Filho et al., 2002), bivalvos (Amorim y Vasconcelos, 1999; Dionisio Pires et al., 2004, Sabatini et al., 2011), crustáceos (Vasconcelos et al., 2001; Magalhães et al., 2003), numerosas especies de peces (Magalhães et al., 2003; Soares et al., 2004; Cazenave et al., 2005; Zhang et al., 2007; Xie et al., 2004, 2005; Deblois et al., 2011), así como también en otros vertebrados acuáticos como tortugas, patos y otras aves (revisión de Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011).

Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, (2011) concluyen que los invertebrados acumulan más MC que los peces y, dentro de los invertebrados, las especies del zooplancton son las que más MC acumulan, alcanzando valores de $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ mts, con un promedio de $383 \mu\text{g g}^{-1}$ mts. A estos organismos les siguen los bivalvos con valores máximos de MC acumulada de $630 \mu\text{g g}^{-1}$ y un promedio de $57 \mu\text{g g}^{-1}$ mts.

Sin embargo, algunos trabajos muestran que es poca la cantidad de toxina acumulada en el organismo respecto del total ingerido, representando la MC acumulada, por ejemplo, menos del 3% en individuos de *Daphnia spp.* y *O. mykiss*. A su vez, la fracción de MC acumulada estaría sujeta a procesos de detoxificación y excreción, que conducen a biodilución de la toxina a lo largo de la cadena trófica. A pesar de que esto parece ser un escenario común para MC y otras cianotoxinas, se ha detectado presencia de estas toxinas en los niveles tróficos superiores, incluso en concentraciones que resultan peligrosas para la salud (revisiones de Ibelings y Chorus, 2007; Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011).

Los peces dulceacuícolas de la Patagonia y su relación con las cianotoxinas, situación regional

La acuicultura aporta casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación (FAO 2013). Debido a la sobreexplotación de los

océanos, las capturas de numerosas especies han ido decreciendo desde la década de 1970 mientras que los desarrollos acuícolas se han ido incrementando en base a la demanda de alimento. Este fenómeno ha empujado a la acuicultura desde técnicas extensivas a prácticas intensivas, donde se desarrolla mayor carga de peces y se utiliza alimentación artificial. Las técnicas intensivas de cría tienen severas consecuencias para el ambiente, debido a que aportan nutrientes y materia orgánica al agua, con el alimento en exceso, que no llega a ser consumido por los peces y por la acumulación de desechos que estos producen. Este aumento de nutrientes, junto con el aumento de la temperatura, favorece el crecimiento excesivo de algas y cianobacterias.

En la provincia del Neuquén, se ha detectado la presencia de varias especies de cianobacterias potencialmente tóxicas, como *Microcystis aeruginosa* y *Dolichospermum spp. (Anabaena)*, habiéndose registrado frecuentes floraciones de estas últimas (Puig, 1992; Echenique y Aguilera, 2009; Othaz Brida et al., 2010). Estas floraciones se han encontrado en importantes represas de la cuenca del río Limay, de las cuales se extrae agua para potabilización y que albergan poblaciones de peces de alto valor alimentario y turístico y sustentan una importante producción de piscicultura. Wenzel y Díaz (2008) describen la presencia de cianobacterias, muchas de ellas dominantes en floraciones y potencialmente tóxicas, en ambientes acuáticos de la Patagonia. Sin embargo, las condiciones oligotróficas de estas aguas generalmente no favorecen el desarrollo de floraciones, por lo tanto, para los peces de la región, la exposición más probable a cianotoxinas sería a concentraciones subletales.

La trucha arco-iris y el pejerrey patagónico

La trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), orden Salmoniformes, familia Salmonidae, es originaria de ríos y lagos de Norte América; desde donde ha sido introducida en el mundo entero, incluyendo la Patagonia. En esta región, es una de las especies más importantes económicamente y en la cual se basa gran parte de la

acuicultura local, principalmente por su alta calidad para la pesca deportiva y para el consumo humano.

O. mykiss fue definida como típica carnívora y predadora, con una dieta conformada principalmente por animales del plancton, necton y bentos (Compagnucci et al., 1992). Posee un esófago corto, que se continúa en un estómago musculoso bien desarrollado. Inmediatamente después del estómago, se encuentra la primera porción del intestino, donde se conectan numerosos ciegos pilóricos (fig. 2). Estos ciegos aumentan la superficie de la mucosa intestinal y en los mismos, continúa la digestión enzimática y comienza la absorción de nutrientes (Rust, 2002). Como es característico en peces carnívoros, el intestino es corto en relación con el tamaño corporal.

Por su tipo de dieta, no es esperable que *O. mykiss* consuma cianobacterias en forma directa pero se ha propuesto que puede incorporar toxinas mediante bioacumulación y transferencia trófica, como en los salmónidos nombrados en la sección anterior, que sufren “*net pen liver disease*” (Andersen et al., 1993; Williams et al., 1997a) o por consumo accidental al ingerir agua contaminada junto con el alimento.

O. mykiss es una especie que se ha utilizado como modelo experimental en varios estudios de intoxicación con cianobacterias y MCLR (Tencalla y Dietrich, 1997; Bury et al., 1998; Fischer y Dietrich, 2000; Best et al., 2003, Boaru et al., 2006, entre otros.). Esta información previa hace a esta especie un buen modelo para poner a prueba nuevas hipótesis, utilizando técnicas poco o nada utilizadas hasta ahora en peces y para realizar estudios comparados con especies nativas, de las cuales existe menos información biológica.

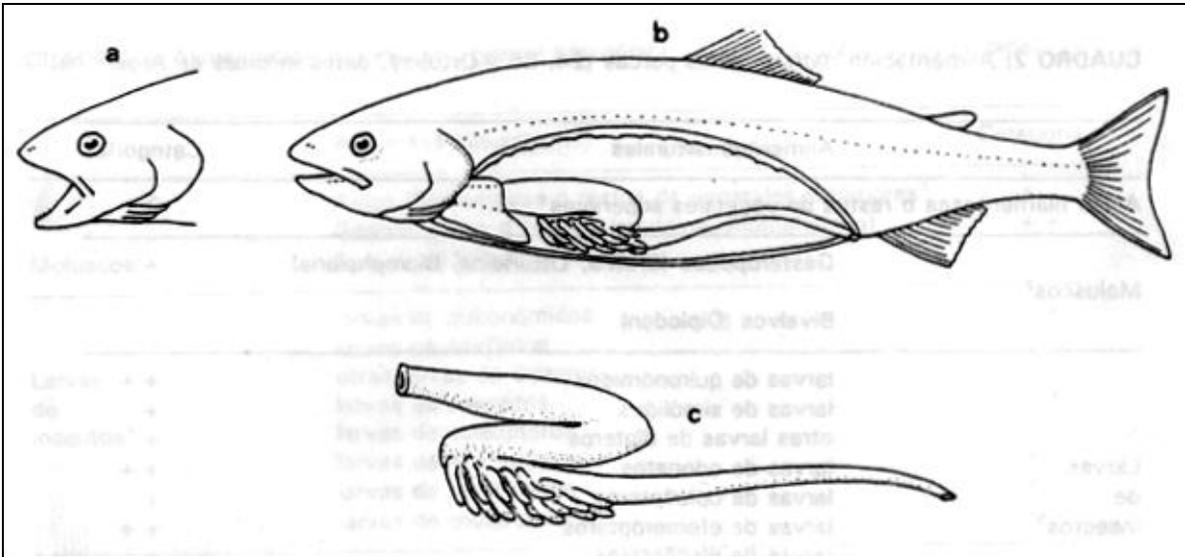


Figura 2. Detalle del sistema digestivo de *Oncorhynchus mykiss*. Extraído de Compagnucci et al. (1992)

El pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*), orden Atheriniformes, familia Atherinopsidae, es un pez óseo nativo de lagos y ríos de la Patagonia, Argentina, que se explota comercialmente por la excelente calidad de su carne. Actualmente su consumo e importancia derivan de la pesca debido que no se logró aún desarrollar su cultivo comercial, aunque su potencial para acuicultura es un tema de estudio en la actualidad (Hualde et al., 2011).

Al igual que otros miembros de la familia Atherinopsidae, *O. hatcheri* carece de estómago funcional (Horn et al., 2006) (fig. 3). Posee un intestino que suele ser largo (incluso hasta más del doble del largo corporal) y, a diferencia de *O. mykiss*, no presenta ciegos pilóricos y termina en una válvula intestinal.

O. hatcheri, es una especie planctívora-omnívora, que posee una dieta variada, determinada principalmente por la oferta del ambiente y la edad del individuo (Compagnucci et al., 1992). Los juveniles son mayormente zooplanctófagos, consumen copépodos, cladóceros y ostrácodos y frecuentan orillas vegetadas. Mientras que los adultos presentan un régimen omnívoro con predilección por animales, ya sea bentónicos, nectónicos o del perifiton. Los moluscos como *Chilina gibbosa* son parte importante de la dieta de *O. hatcheri* y,

entre los componente secundarios de la dieta, se pueden encontrar algas filamentosas (*Ulothrix sp.*, *Zignema sp.*, *Spirogyra sp.*), larvas de coleópteros e insectos terrestres adultos (Ferriz, 1993/94).

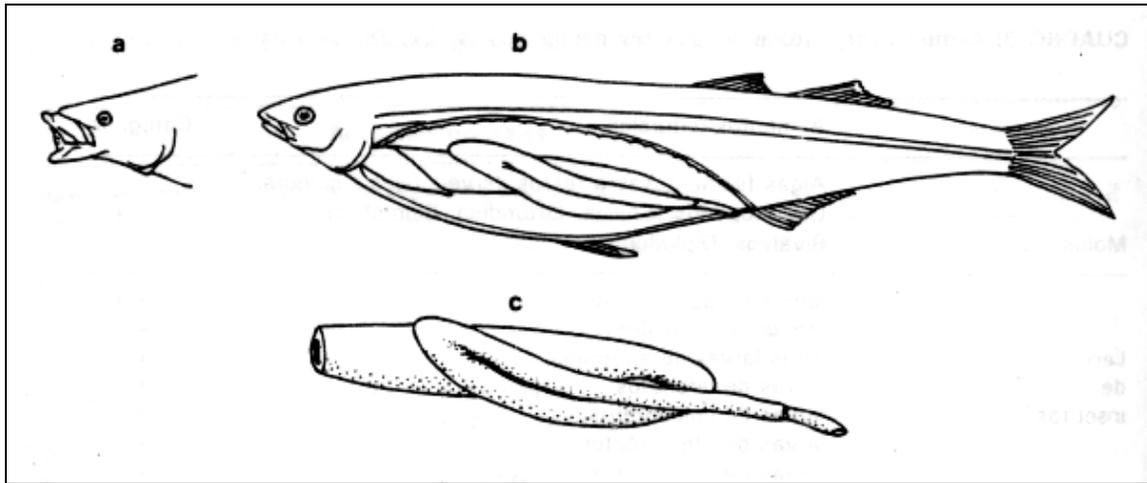


Figura 3. Detalle del sistema digestivo de *Odontesthes hatcheri*. Extraído de Compagnucci et al. (1992)

O. hatcheri se encuentra, por ejemplo, en ambientes como el Embalse Exequiel Ramos Mexía, donde es abundante y coexiste con frecuentes floraciones de cianobacterias (Puig, 1992). Además, se ha registrado la presencia de cianobacterias en el tracto gastrointestinal de individuos de *O. hatcheri* capturados en dicha región (Hualde et al., 2011) y en Chile (Vila y Soto, 1981). También existen antecedentes de acumulación de MCCR en individuos de *O. bonariensis*, especie cercana a *O. hatcheri*, capturados en un embalse eutrofizado de la provincia de Córdoba (Cazenave et al., 2005). A pesar de estos antecedentes de consumo de cianobacterias por individuos de *O. hatcheri* y de los estudios donde se observó acumulación de MC en tejidos de *O. bonariensis*, aun no es clara la relación de las cianobacterias y sus toxinas con esta especie. En particular, se plantean los siguientes interrogantes sobre la relación de *O. hatcheri* con las cianobacterias y, en particular, con la toxina MCLR:

✓ ¿El tracto digestivo de *O. hatcheri* es capaz de digerir las cianobacterias y absorber MCLR?

- ✓ ¿Cuáles son los efectos tóxicos que provoca la captación de MCLR en esta especie?
- ✓ ¿Se acumula dicha toxina en los tejidos? ¿Representa un riesgo para el consumo humano?
- ✓ ¿*O. hatcheri* posee algún mecanismo de defensa (metabolismo y detoxificación) frente a la acumulación y efectos tóxicos de MCLR?

Teniendo en cuenta los interrogantes planteados, en esta tesis se propone estudiar la capacidad de *O. hatcheri* para digerir cianobacterias, los consiguientes efectos tóxicos de la absorción de MCLR y la cinética de acumulación de la toxina. Se utilizarán datos bibliográficos comparativos de *O. mykiss* para evaluar las diferencias entre especies de distintas características tróficas. Además se plantea estudiar los mecanismos involucrados en la absorción, biotransformación y excreción de MCLR a nivel celular en intestino de *O. hatcheri* y *O. mykiss*.

Se seleccionó una variante de MC como toxina de estudio, debido a que estos compuestos fueron detectados en la región Norpatagónica (Pose et al., 2008), donde se centró este trabajo de tesis y sus efectos adversos representan un riesgo potencial tanto para la potabilización y consumo de agua, como para la producción pesquera de la zona y la salud ambiental de los cuerpos de agua. En particular se trabajó con MCLR debido a que esta toxina se encuentra disponible comercialmente como estándar de laboratorio y dentro de las cianotoxinas, MCLR es una de las más estudiadas en cuanto a efectos tóxicos y es la única sobre la cual existe alguna información sobre transporte celular (aunque muy escasa), características que la convierten en un modelo útil para estudiar mecanismos de transporte y acumulación de cianotoxinas.

En cuanto a los modelos experimentales, se seleccionó para este trabajo a *O. mykiss* (trucha arco-iris) por ser una especie de importancia ecológica y económica para la región de estudio, sobre la cual existe amplia información biológica y toxicológica, incluyendo trabajos sobre acumulación y efectos de MCLR. Por otro

lado, el hecho de contar con información básica sobre la toxicidad de MCLR, permitió seleccionar para el estudio a *O. hatcheri*, especie nativa de gran importancia ecológica y económica en la región norpatagónica, sobre la que existe poca información biológica.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar las vías de ingreso al organismo, acumulación, mecanismos de toxicidad, de detoxificación y eliminación de la cianotoxina microcistina-LR en peces de agua dulce de consumo humano (pejerrey patagónico, *Odontesthes hatcheri* y trucha arco-iris, *Oncorhynchus mykiss*).

HIPÓTESIS GENERALES

- *O. hatcheri* es un pez planctívoro-omnívoro, que consume cianobacterias accidentalmente o como parte de su alimento. Su sistema digestivo tiene la capacidad de romper las paredes de las células cianobacterianas, liberando toxinas, como microcistina-LR, que pueden dañar a la mucosa intestinal. Las cianotoxinas pueden acumularse en distintos órganos, especialmente en intestino e hígado, donde provocan daños por inhibición de enzimas y/o estrés oxidativo.
- En los peces (*O. hatcheri* y *O. mykiss*, en este estudio), la primera barrera de defensa contra las cianotoxinas es la secreción de mucinas, que recubre epitelio intestinal (glicocálix). Una vez absorbidas, las cianotoxinas, en particular MCLR, pueden ser biotransformadas en los enterocitos por conjugación con GSH y exportadas hacia el lumen intestinal (detoxificación) y/o hacia la sangre (completando la absorción), mediante transportadores tipo Abcc de ubicación apical y basolateral, respectivamente.

METODOLOGÍA GENERAL

1. Reactivos utilizados

Estándar de MCLR de 3 mg L⁻¹ gentilmente donada por los Dres. Wayne Carmichael y Sandra Azevedo; estándar de 3 mg L⁻¹ MCLR de DAOS (Argentina) y 10 µg MCLR liofilizada ALEXIS Biochemicals (San Diego, CA). Glutatión reducido (GSH), 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB), seroalbúmina bovina (BSA), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), ácido tiobarbitúrico (TBA), KIO₄, Na₂SO₄, ácido tricloroacético (TCA), colorante Commassie brilliant blue G250, ditiotreitól (DTT), MK571, ácido 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), comprados a Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) comprado en Serva (Alemania). Hexano, *para*-nitrofenil fosfato sal disodica (*p*NPP), dietil-éter, ácido trifluoroacético (TFA), MgCl₂ y HCl comprados a Merck (Alemania). Na₂CO₃ y KCl comprados a Anedra (Argentina). MnCl₂ y KMnO₄ comprados a Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ). Calceína acetoximetil éster (calceína-AM, de Calbiochem, San Diego, CA), gentilmente donada por el Dr. Amro M. Hamdoun (Scripps Institution of Oceanography, UCSD).

Los anticuerpos y la microplaca sensibilizada con antígenos utilizados para ELISA fueron obtenidos a través de trabajos en colaboración con la Dra. Beatriz Brena (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). El resto de los reactivos químicos utilizados para ELISA fueron de grado analítico.

Para lectina-histoquímica se utilizaron: Lectina de germen de trigo (WGA) biotinilada, concanavalina A-Fluoresceína (ConA-FITC) succinilada y no succinilada, aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) biotinilada (Vector labs, Burlingame, CA), estreptavidina-rodamina (Life Technologies, Gaithersburg, MD), Ioduro de propidio (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Para inmunohistoquímica, los anticuerpos primarios utilizados fueron: Anti-MRP2 mAb (M2III-6) monoclonal (ENZO Life Science, New York, USA), Anti-MRP4 ab77184 policlonal (ABCAM, Cambridge, MA), Anti-ABCG2 (M-70): sc-25822 policlonal y Anti-Mdr (H-241): sc-8313 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), los cuales fueron obtenidos a través de trabajos en

colaboración con la Dra. Silvina S.S.M. Villanueva (IFISE, Universidad Nacional de Rosario, Argentina). También se utilizaron anticuerpos secundarios anti-ratón biotinilado (Dako, CA), anti-conejo y anti-cabra biotinilado (Chemicon, CA). Streptavidina-HRP (horse rabbit peroxidase) y bálsamo sintético (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), diaminobenzidina (DAB) (Dako, CA).

2. Individuos de *O. mykiss* y *O. hatcheri*

Los ejemplares de *O. mykiss* y *O. hatcheri* fueron obtenidos del Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), Junín de los Andes, Argentina. Se mantuvieron en acuarios (8 kg/m³) con agua proveniente del río Chimehuín. Cada acuario se mantuvo con sistema continuo de circulación de agua, aireación y filtrado. La temperatura y la iluminación variaron con su régimen natural. Antes de realizar cada experimento, los individuos a utilizar fueron separados y aclimatados a 20 ± 5 °C por una semana. Los peces fueron alimentados con balanceado comercial para trucha (Ganave, Pilar S.A., Argentina) y alimento para pejerrey formulado en el CEAN y producido por Molino Don Antonio S.A., La Pampa, Argentina (Hualde et al., 2011). Se suministró el 1% del peso corporal como ración diaria de alimento, salvo durante las 24 - 48 horas previas a cada experimento, cuando fue suspendida la entrega de alimento. Los protocolos de todos los diseños experimentales y la manutención de los animales en laboratorio fueron aprobados por el comité de bioética de la facultad de bioquímica y farmacia de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina (6060/116).

3. Cultivos de *Microcystis aeruginosa*

Se utilizaron dos cepas de *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae, Chroococcales) (fig. 1), una de ellas productora de toxinas, mayormente MCLR (cepa NPJB1), en una concentración de 230 ± 27 µg equivalentes de MCLR/10⁶ células (Azevedo et al., 1994; Brena et al., 2006); y otra cepa no tóxica (NPDC1). Ambas cepas fueron gentilmente cedidas por la Dra. Raquel Soares, Universidad

Federal de Río de Janeiro, Brasil. Los cultivos de *M. aeruginosa* se mantuvieron axénicos, en Erlenmeyers de 50 mL con 20 mL de medio de cultivo ASM-1 (Anexo I, Tabla 1, pág. 196) (Gorham et al., 1964, Sabatini, 2010), en condiciones controladas de luz y temperatura (20 ± 2 °C, con ciclos de 12 horas luz-oscuridad con luz fría fluorescente).

Para cuantificar el número de células se utilizó la técnica de conteo directo en una cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad, utilizando un microscopio óptico Olympus a 400 x. La suspensión de cianobacterias se diluyó con medio ASM-1 para obtener una concentración óptima de células para realizar el recuento. El número de células mL⁻¹ se estimó con un error estándar (EE) menor que 10%, calculado como:

$$EE (\%) = [DE * (n^{1/2} * X)^{-1}] * t_{(n-1; 1-\alpha)} * 100$$

Dónde:

DE: Desvío estándar

n : Número de celdas contadas

X: Densidad celular promedio por celda

t_(n-1; 1-α) : Valor crítico de la distribución t

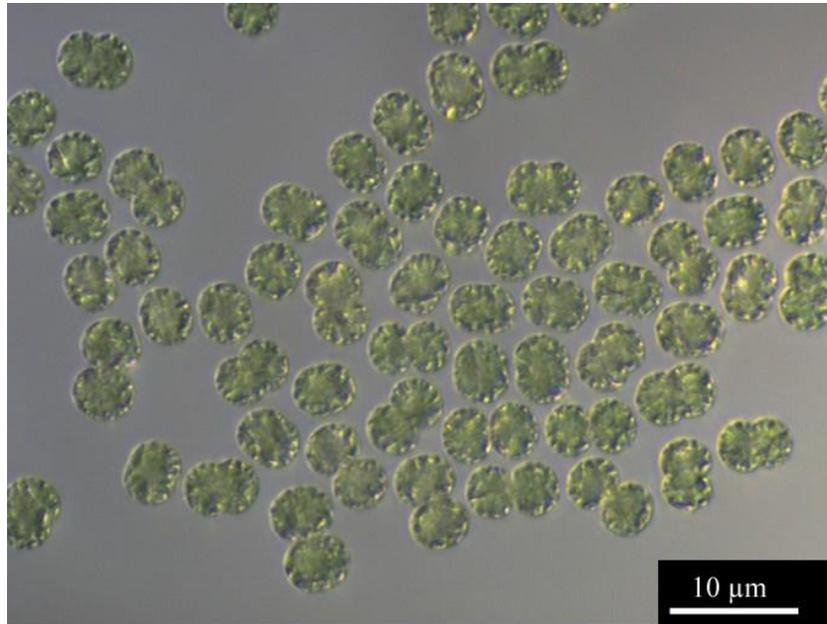


Figura 1. Microcystis aeruginosa. Foto extraída de <http://mcc.nies.go.jp//strainList.do?strainId=71>.

4. Extracción y purificación de MCLR

Las técnicas para estos procedimientos se basaron en los trabajos de Williams et al. (1997a); Carmichael y An (1999) y Lawton y Edwards (2001).

4.a) A partir de muestras de tejido: Se homogenizó el tejido en metanol 100% (10 mL/gramo de tejido). Se incubó por 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 11000 x g durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se repitieron los pasos anteriores dos veces más, hasta obtener la combinación de tres sobrenadantes metanólicos por muestra. Se evaporó el metanol por pasaje de N₂, hasta obtener un residuo oleoso húmedo que se resuspendió en agua bidestilada-TFA 0,1%. Se aseguró que cada muestra no tuviera más del 10% de metanol para no afectar las mediciones posteriores. Se continuó la extracción y purificación de la toxina mediante extracción en fase sólida (SPE) (ver descripción en 4.c).

4.b) A partir de cultivo de *M. aeruginosa*: De acuerdo a la cantidad de toxina a utilizar, se cuantificaron las células necesarias de *M. aeruginosa*. Se separaron los mL de cultivo que las contuvieran, se centrifugó a 10000 x g por 30 minutos y se

resuspendió el pellet de células en agua destilada (lavado) para volver a centrifugarlas. De esta forma se asegura que no se arrastre MCLR libre en el medio de cultivo. Posteriormente, las células fueron sometidas a procesos físicos para lograr la ruptura y liberación de la MCLR. Esto se realizó con ciclos de congelado y descongelado del pellet de células (3 veces), resuspensión en metanol 100% y agitación fuerte con vórtex. La presencia de células rotas se comprobó al microscopio óptico (1000 x). Luego de una hora, se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos y el pellet resultante se volvió a resuspender en metanol. Se repitió el procedimiento hasta obtener la combinación de 3 sobrenadantes metanólicos por muestra. Se evaporó el metanol por pasaje de N₂ hasta obtener un residuo húmedo y luego se agregó agua bidestilada-0,1% TFA. Se procuró que cada muestra no tuviera más del 10% de metanol para no afectar las mediciones posteriores. Se continuó la extracción y purificación de la toxina mediante SPE.

4.c) Purificación de MCLR por SPE: A lo largo de esta tesis se utilizaron microcolumnas C18 ZipTip (Millipore, USA) y columnas C18 Sep-Pak Vac 1cc, 50 mg (Waters, USA). Cada una se acondicionó con las soluciones y volúmenes recomendados teniendo en cuenta los protocolos provistos con el producto, el protocolo de extracción y purificación del laboratorio de la Dra. Beatriz Brena y las descripciones de Carmichael y An (1999). Esta técnica, además de concentrar la toxina, reduce la cantidad de pigmentos de la muestra y elimina compuestos inorgánicos que pueden interferir en las mediciones, como NaF, que es inhibidor de enzimas PP (Carmichael y An, 1999).

En primer lugar, para acondicionar el lecho de la columna, se lavó con acetonitrilo (ACN) 100%, como solvente orgánico. De esta forma se buscó remover el aire atrapado en la columna y preparar los ligandos para la interacción con la muestra (fig. 2). Luego, se equilibró la columna con el solvente de dilución de la muestra, agua bidestilada-TFA 0,1%. Inmediatamente, para evitar el secado de la columna, se sembró la muestra en la misma. Este paso se hizo lentamente (flujo óptimo de 1-2 mL min⁻¹), para que MCLR fuera retenida en la columna. Por último,

se lavó con solución de equilibrio (agua bidestilada-TFA 0,1%) y se eluyó la toxina retenida en la columna con metanol 80%. Como resultado de este procedimiento, se obtuvo la toxina purificada y concentrada. Para la cuantificación de lo extraído o su uso en experimentos, se evaporó el metanol por pasaje de N₂ y se resuspendió en agua, siempre manteniendo la concentración de metanol menor que 10%.

El contenido y la pureza de MCLR en los extractos se determinó cuantitativamente con las técnicas de ELISA (ensayo inmunoenzimático) y PPIA (ensayo de inhibición de proteína fosfatasa). La identidad de la toxina fue confirmada cualitativamente por la Dra. Beatriz Brena (Montevideo, Uruguay) mediante la técnica de MALDI-TOF, usando un equipo Microflex LR (Bruker Daltonics, Billerica, MS, USA) con un láser de N₂, 337 nm, operado en modo reflectrón ion positivo (Welker et al., 2002).

Los procedimientos de extracción y medición de MCLR se validaron mediante la inyección de cantidades conocidas de toxina en homogenato control (en inglés “*spikes*”), que se sometieron a extracción metanólica y purificación por SPE para luego calcular el porcentaje de recuperación. El porcentaje de recuperación de los *spikes* fue del 72 ± 6 %; $n=3$. El análisis de las muestras fue ajustado según este valor de recuperación.

5. Extracto tóxico de MCLR

A lo largo del tiempo, se controló la cantidad de MCLR producida por los cultivos de *M. aeruginosa* mediante PPIA (ver técnicas a continuación). Luego de un año, el cultivo perdió la capacidad productora de toxina y a partir de ese momento se utilizaron extractos tóxicos provenientes de floraciones de cianobacterias, obtenidos en colaboración con la Dra. Beatriz Brena, Universidad de la República, Uruguay.

Para obtener extractos concentrados de MCLR, la toxina se purificó de una floración natural de *Microcystis sp.* Para esto, las células de cianobacterias suspendidas en agua se sometieron a 3 ciclos de congelado-descongelado, seguidos

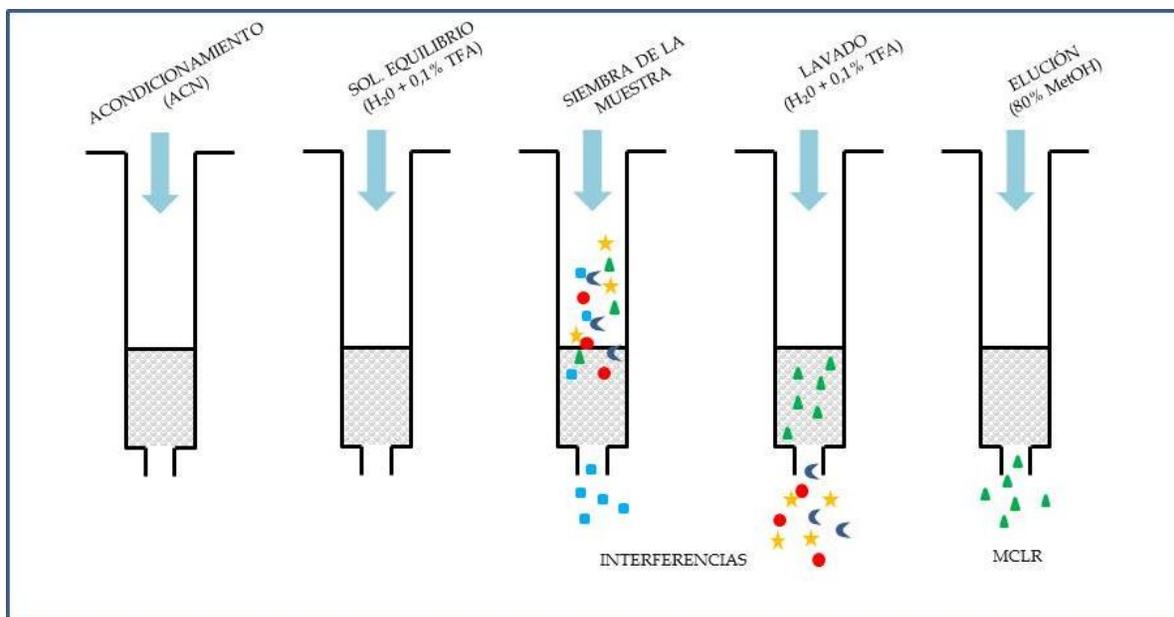


Figura 2. Esquema general de los pasos realizados en columnas C18. De izquierda a derecha: acondicionamiento mediante el agregado de acetonitrilo; agregado de solución de equilibrio compuesta por agua bidestilada-0,1%TFA; siembra la muestra, la cual posee el metabolito que se desea seleccionar (que quedará retenido en la columna) y otros compuestos que son impurezas; lavado con agua bidestilada-0,1% TFA que arrastra las interferencias; extracción del metabolito retenido en la columna mediante el agregado de metanol 80%.

por una centrifugación a $2500 \times g$ durante 10 minutos. Luego se aplicó un volumen de 450 mL a una columna C18 de 8,5 g (Phenomenex, CA, USA). El soporte de la columna se preparó pasando 170 mL de metanol y el mismo volumen de agua. La muestra se lavó con 150 mL de agua:metanol 90:10 y se eluyó con 20 mL de metanol. El extracto de MCLR se cuantificó por HPLC/UV (Waters 1525) usando una columna Phenomenex Luna ($5\mu\text{m}$ C18 $250 \times 4,6$ mm). La columna analítica se eluyó con dos pasos de gradiente de acetonitrilo (Brena et al., 2006). La salida se registró a 238 nm y los picos correspondientes a MCRR, MCYR y MCLR se cuantificaron utilizando los estándares apropiados. En el extracto solo se encontró MCLR en una concentración de 1800 mg L^{-1} (elución metanólica) (fig. 3). La presencia de MCLR y la ausencia de otras variantes de MC fueron confirmadas por la técnica de MALDI-TOF.

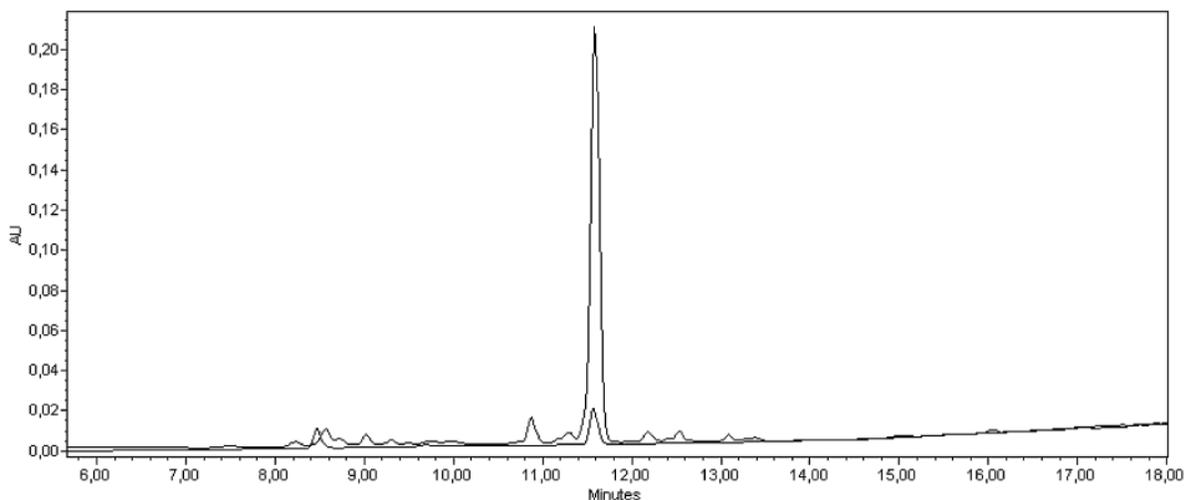


Figura 3. Cromatograma de HPLC del extracto de microcistina en dilución 1/100 (pico mayor) y 2 mg L⁻¹ de estándar de MCLR (pico menor).

6. Procesamiento de tejidos

En todos los experimentos donde se midió actividad enzimática, concentración de GSH, peroxidación lipídica (MDA) y proteínas, los tejidos se procesaron con 4 mL de buffer de homogeneización (Tris 40 mM, KCl 20 mM, Cl₂Mg 30 mM, pH 8,6) por cada 0,5 g de tejido. Salvo en los casos donde se debía medir actividad de PP, en todos los demás se agregó PMSF (concentración final 2 mM) como inhibidor de proteasas. Se utilizó un homogeneizador teflón-vidrio o un homogeneizador eléctrico Omni 1000, a 20000 rpm. Se centrifugó a 12000 x g por 15 minutos, a 4° C y se colectó el sobrenadante de cada muestra para las mediciones bioquímicas.

7. Análisis bioquímicos (capítulos I y II)

7.1 Actividad de PP1:

La actividad de esta enzima se midió de acuerdo a Carmichael y An (1999) con ligeras modificaciones. Es un ensayo colorimétrico, en el que se utiliza *p*NPP como sustrato. La sensibilidad del método está en el orden de µg L⁻¹. Las PP son capaces de desfosforilar el *p*NPP, produciendo paranitrofenol, que da un color

amarillo detectable en espectrofotómetro a 405 nm. Para la medición, se utilizó el sobrenadante de cada muestra y se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: DDT, 3 mM en buffer de homogeneización
- Solución B: BSA, 1,5 mg mL⁻¹ en buffer de homogeneización
- Solución C: MnCl₂, 1,5 mM en buffer de homogeneización
- Solución D: 1 mL solución A + 1 mL solución B + 1 mL solución C
- Solución E: *p*NPP 15 mM disuelto en la solución D (concentración modificada respecto de la utilizada en Carmichael y An, 1999)

En microplaca, por pocillo se agregaron 90 µL de Solución D + 10 µL de muestra. En el pocillo de blanco, en vez de muestra se agregaron 100 µL de solución D. Se mezcló e incubó durante 5 minutos. Se agregaron 100 µL por pocillo de solución E y luego de mezclar e incubar durante 5 minutos, se registró la absorbancia a 405 nm, cada 5 minutos, durante 40 minutos, a 25 °C. Cada muestra se midió por triplicado, se graficaron las lecturas y se obtuvo la regresión lineal para cada una. La pendiente de absorbancia en función del tiempo se utilizó para estimar la actividad enzimática a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad PP1 (nKat mg proteína}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Pendiente-Blanco}) * \text{vol. Cubeta}}{\text{Vol. Alícuota} * \epsilon * \text{camino óptico} * \text{proteínas}}$$

Dónde:

ϵ = Coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol: 18000 M⁻¹ cm⁻¹

Camino óptico = 0,5 cm

Se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada muestra como: $DE * X^{-1}$ (%), donde “DE” es el desvío estándar y “X” la media de las réplicas. Se consideraron sólo las muestras que no superaron el 15% de CV.

NOTA: Para medir PP1 y PP2A se utilizaron homogenatos sin el agregado de PMSF debido a que se observaron interferencias en la medición producto del mismo, coincidiendo con lo descrito por Carmichael y An (1999), donde los autores describen que compuestos inorgánicos como el NaF son inhibidores de enzimas PP y pueden dar falsos positivos. Las mediciones de estas enzimas se hicieron inmediatamente para evitar la degradación enzimática.

7.2 Actividad de PP2A:

La actividad de esta enzima se midió de acuerdo a Heresztyn y Nicholson, (2001). Para esto se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución Enzima: Buffer Tris 80 mM con EGTA 0,19 mM, pH 7 + DTT 20 mM disuelto en acetato de sodio 10 mM, pH 5,2 + MnCl_2 10 mM disuelto en agua destilada + BSA 5 mg mL⁻¹. (65:5:20:10 v/v).
- Buffer de reacción: buffer-Tris 250 mM (sin EGTA), pH 8,1 + MnCl_2 10 mM disuelto en agua destilada + MgCl_2 200 mM disuelto en agua destilada + 5 mg mL⁻¹ BSA. (50:4:26:20 v/v).
- Solución sustrato: Buffer de reacción + *p*NPP 60 mM disuelto en agua destilada + DTT 20 mM disuelto en acetato de sodio 20 mM. (5:4:1 v/v).

En microplaca, por pocillo se agregaron 10 μL de solución enzima + 10 μL de muestra, excepto en el pocillo de blanco donde en vez de sobrenadante, se agregaron 20 μL de solución enzima. Luego de incubar 5 minutos se agregaron 180 μL de solución sustrato. Se incubó y mezcló durante 5 minutos y se registró absorbancia a 405 nm, cada 5 minutos, durante 40 minutos, a 25 °C. Cada muestra se midió por triplicado, y el análisis de los datos se realizó al igual que para PP1.

7.3 Actividad Glutación-S-transferasa (GST):

Estas enzimas catalizan la conjugación de diversas moléculas, entre las que se encuentra MCLR, con el tripéptido GSH. Para medir dicha actividad, se utilizó el protocolo de Habig et al. (1974). Los reactivos utilizados fueron:

- Buffer fosfato 100 mM a pH 6,5
- Solución de GSH 100 mM en buffer fosfato a pH 6,5
- Solución de 1-cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB) 100 mM disuelto en etanol

En cubeta de cuarzo, se mezclaron 1,96 mL de buffer fosfato, 10 μ L de solución de GSH y 30 μ L de muestra. Luego de mezclar, se agregaron 10 μ L de CDNB para iniciar la reacción, se volvió a mezclar e inmediatamente se registró la absorbancia a 340 nm, cada 30 segundos, durante 5 minutos, a 25 °C. A esta longitud de onda se detecta el producto de la conjugación del CDNB con GSH (DNP-SG). Cada muestra se evaluó por duplicado. Se calculó la pendiente de absorbancia en función del tiempo y la actividad enzimática se expresó como nKat mg proteína⁻¹:

$$\text{Actividad GST (nKat mg proteína}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Pendiente-Blanco}) * \text{vol. Cubeta}}{\text{Vol. Alícuota} * \epsilon * \text{camino óptico} * \text{proteínas}}$$

Dónde:

ϵ = Coeficiente de extinción molar del DNP-SG: 9,6 M⁻¹ cm⁻¹

Camino óptico = 1 cm

7.4 Actividad catalasa (CAT):

CAT participa en la detoxificación de peróxido de hidrógeno mediante una reacción que genera agua y una molécula de oxígeno. La actividad de CAT se midió siguiendo el protocolo de Aebi et al. (1984), midiendo la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno mediada por la actividad de esta enzima. La velocidad de descomposición del H₂O₂ es directamente proporcional a la

velocidad enzimática. Para medir la actividad de esta enzima se utilizaron las siguientes soluciones:

- Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7
- Solución de H₂O₂ 10 mM

En una cubeta de cuarzo se colocaron 1,92 mL de buffer fosfato de potasio y 40 µL de solución de H₂O₂. Se tomó la lectura del valor de absorbancia a 240 nm como línea de base (blanco) y luego se agregaron 40 µL de muestra. Se agitó y, luego de esperar 10 segundos, se registró la absorbancia a 240 nm, cada 2 segundos, durante 30 segundos, a 25 °C. Luego se calculó la pendiente de absorbancia en función del tiempo y la actividad enzimática se expresó como nKat mg proteína⁻¹:

$$\text{Actividad CAT (nKat mg proteína}^{-1}\text{)} = \frac{|\text{Pendiente-Blanco}| * \text{vol. Cubeta}}{\text{Vol. Alícuota} * \epsilon * \text{camino óptico} * \text{proteínas}}$$

Dónde:

ϵ = Coeficiente de extinción molar del H₂O₂: 40 M⁻¹ cm⁻¹.

Camino óptico = 1 cm

7.5 Concentración de glutatión reducido (GSH):

Para determinar la concentración de GSH (L-γ-glutamyl-L-cisteínglicina) se siguió la técnica de Ellman (1959), modificada por Venturino et al. (2001). Esta técnica se basa en la reacción del grupo tiol (SH) del GSH con el reactivo DTNB dando TNB como producto, el cual se forma por ruptura del puente S-S en el DTNB. Para esta técnica se prepararon las siguientes soluciones:

- Buffer fosfato 250 mM, pH 8
- Solución sustrato: DTNB 1,5 mM disuelto en buffer fosfato 250 mM, pH 8

- Soluciones de ácido sulfosalicílico (SSA) 5, 10 y 15%
- Solución estándar de GSH 0,8 mM en SSA 5%.

Cada muestra se mezcló con SSA 15% (2 partes de muestra y 1 de SSA), se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se utilizó para las mediciones de GSH. En cada pocillo de una microplaca, se colocaron 20 μ L de muestra y 180 μ L de solución sustrato. Se realizó una curva de calibración de 1 a 16 nmol GSH. Luego de 5 minutos de incubación, se tomó una lectura única de absorbancia a 405 nm. Se trabajó a 25 °C y cada muestra se midió por triplicado. El resultado, expresado como nmol GSH mg proteína⁻¹, se calculó como:

$$\text{nmol GSH mg proteína}^{-1} = \left(\frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) * \text{factor}}{\text{Vol. Alícuota} * \text{proteínas}} \right) * \text{dilución}$$

Dónde:

Factor = 1/pendiente de la curva de calibración

7.6 Peroxidación lipídica:

La cuantificación de los peróxidos lipídicos, a través de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Beuge y Aust (1978), con ligeras modificaciones. En esta técnica, los productos de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, tales como peróxidos lipídicos, entre los que se encuentra el malondialdehído (MDA), reaccionan con el ácido tiobarbitúrico en medio ácido, a alta temperatura, para dar un compuesto MDA-TBA de color rosado, que puede medirse en espectrofotómetro a 532 nm.

Para esta técnica se preparó la siguiente solución:

- Solución de reacción: TCA 15 % m/v, TBA 0,375 % m/v, HCl 2 % v/v, BHT 6,8 mM disuelto en etanol.

Cada muestra se mezcló con solución de reacción y se incubó a 95 °C, a baño maría, durante 15 minutos. Luego de dejar enfriar se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos y la absorbancia del sobrenadante se leyó a 532 nm. Los resultados se expresaron como ng MDA mg proteína⁻¹. Cada muestra se midió por triplicado. La concentración de MDA se estimó como:

$$\text{nmol MDA mg proteína}^{-1} = \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) * \text{vol. Cubeta}}{\text{Vol. Alícuota} * \epsilon * \text{camino óptico} * \text{proteínas}}$$

Dónde:

ϵ = Coeficiente de extinción molar del complejo MDA-TBA: 156 mM⁻¹ cm⁻¹.

Camino óptico = 1 cm

7.7 Determinación de proteínas:

El contenido total de proteínas solubles en las muestras analizadas se midió por el método de Bradford (1976). Para esta técnica se preparó:

- Solución estándar de seroalbúmina bovina (BSA) de 0,1 mg mL⁻¹
- Reactivo Bradford

En cada cubeta, se agregaron 5 µL de muestra y 1 mL de reactivo Bradford. Para realizar la curva de calibración, en vez de muestra, se agregó solución estándar de BSA, en las cantidades necesarias para obtener una curva de 0 a 10 µg BSA. Luego de mezclar e incubar 10 minutos, se tomó una lectura de absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresaron como mg de proteína mL⁻¹ y fueron calculados como:

$$\text{mg proteína mL}^{-1} = \left(\frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) * \text{factor}}{\text{Vol. Alícuota}} \right) * \text{dilución}$$

Dónde:

Factor = 1/pendiente de la curva de calibración

En algunos experimentos, se utilizó un kit para medición de proteínas (Qubit-iTTM protein assay kit, Q33211), Invitrogen, Molecular Probes (Oregon, EEUU) y se leyó en un fluorómetro Qubit. Los resultados se expresaron como mg de proteína mL⁻¹.

8. Métodos de detección de microcistina

Existen diversos métodos para detectar cualitativa y cuantitativamente la presencia de MC en muestras ambientales y de laboratorio. Los dos parámetros a considerar a la hora de elegir un método son la selectividad y sensibilidad del mismo. Por lo general, los métodos de escaneo son poco sensibles y selectivos pero son rápidos y sencillos por lo que permiten tener un resultado en corto tiempo y sirven para determinar el riesgo toxicológico. En el otro extremo se encuentran los métodos analíticos complejos, de gran sensibilidad y selectividad pero de mayor costo y complejidad (Ardanaz, 2010). Según Carmichael y An (1999) y Sivonen y Jones (1999), las técnicas de detección se pueden diferenciar en tres tipos:

✓ **Biológicas:** implican el uso de animales pequeños (ratones, peces, cladóceros) y microorganismos (bacterias). Estos métodos brindan un panorama general sobre la presencia y a veces hasta el tipo de toxina presente pero son métodos pocos sensibles (en el orden de mg L⁻¹) y de poca precisión. En general, en estos ensayos una muestra tóxica, que puede ser de composición desconocida, es inyectada por vía intraperitoneal en el animal o se coloca el compuesto tóxico en el medio y se

observa la respuesta toxicológica. Es una técnica sencilla, que se puede realizar en cualquier laboratorio, aunque hoy en día se intenta utilizar la menor cantidad de animales posibles y los comités de ética desaconsejan estos ensayos por el sufrimiento animal que conllevan.

✓ **Bioquímicas:** Estos métodos han reemplazado a los biológicos a la hora de obtener un panorama general del compuesto tóxico, debido a que son muy sensibles ($\mu\text{g L}^{-1}$ o ng L^{-1}) y sencillos de realizar. Dentro de este tipo de métodos se incluyen inmunoensayos (especialmente ELISA, sigla de su nombre en inglés "*Enzyme linked immunosorbent assay*"), mediciones enzimáticas (inhibición de PP *in vitro*: PPIA). Estas técnicas poseen una mayor sensibilidad pero tienen más interferencias, por lo cual son poco selectivas respecto a otras técnicas de medición. Sin embargo, son tan sensibles como las técnicas fisicoquímicas y son económicas, lo que las convierte en herramientas muy utilizadas. Dentro de estos métodos las técnicas de ELISA y PPIA son las más importantes a la hora de determinar MC. La técnica de ELISA implica la utilización de anticuerpos generados contra una variante de microcistina (aunque normalmente hay reacción cruzada con otras variantes) o contra el aminoácido Adda, que es común a todas las microcistinas y nodularinas (Poste et al., 2011). El ensayo de PPIA se basa en la capacidad de las MC y nodularinas para inhibir a la actividad enzimática de PP1 o PP2A.

✓ **Fisicoquímicas:** Comprende los métodos cromatográficos como cromatografía de capa delgada, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), cromatografía gaseosa (CG); acoplados con diferentes detectores (UV, arreglo de diodos, espectrometría de masas) y resonancia magnética nuclear. Estos métodos suelen ser de gran sensibilidad (ng L^{-1} o pg L^{-1}), aunque costosos en comparación con los biológicos o bioquímicos, y su selectividad es intermedia a alta. El método analítico más difundido para la determinación de MC es el que emplea HPLC con un detector por absorción UV. En este método las toxinas son separadas entre sí y de otros compuestos utilizando una columna de fase reversa C18 y luego se determina la absorción a 238 nm. Debido a que a esa longitud se pueden absorber

otros compuestos, esta técnica puede presentar interferencias. Otra posibilidad es utilizar detección por arreglo de diodos o espectrometría de masas, que disminuyen notablemente dichas interferencias y mejoran el límite de detección, por ejemplo, la técnica de MALDI-TOFF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*). Una variante es la oxidación de MC hasta ácido 3-metoxi-2-metil-4-fenilbutanoico (MMPB) y detección por cromatografía gaseosa (o HPLC) y espectrometría de masa (CG/EM o HPLC/EM). Esta técnica permite medir MC total, ya que toda la toxina (nativa, conjugada con GSH o Cis, o unida a proteínas) se transforma en este compuesto. Esta técnica, posee alta sensibilidad y baja selectividad ya que no diferencia entre variantes de MC ni entre MC y ND, debido a que todas estas toxinas poseen el grupo Adda, que es la porción de la molécula que se fragmenta dando el compuesto MMPB (Sano et al., 1992; Kaya y Sano, 1999; Ott y Carmichael, 2006; Ardanaz, 2010).

8.1 Ensayo de inhibición de proteína fosfatasa 1 in vitro (PPIA):

Se utilizó para cuantificar MCLR contenida en cultivos de *M. aeruginosa* (extraíble por metanol) y la fracción soluble en metanol de la MCLR acumulada en muestras de tejidos de *O. hatcheri*, (MCLR nativa + MC-SG + MC-Cis). La ventaja de esta técnica es que es una medición directa de la toxicidad de MCLR aunque presenta como desventaja el hecho de que puede dar falsos positivos. Para evitarlos, se recomienda purificar las muestras por extracción en metanol y SPE (elimina impurezas y precipita enzimas PP propias de la muestra), como se describe en la sección 4. Otra limitación de esta técnica a tener en cuenta, es que la MCLR unida a GSH o Cis puede ser menos inhibitoria que la toxina pura para las PP, por lo tanto se podría subestimar la concentración de MC en la muestra (Ito et al., 2002).

Para realizar esta técnica, se utilizaron las soluciones detalladas para la medición de actividad de PP1 (solución A, B, C y D) y como fuente de enzima se utilizó homogenato de hígado de individuos de *O. mykiss* no tratados. En

microplaca, por pocillo, se agregaron 70 μL de Solución D y 10 μL de enzima. En el pocillo de blanco, en vez de enzima se agregaron 80 μL de solución D. Luego en cada pocillo se agregaron 20 μL de muestra (MCLR purificada de muestra de tejido o de cultivo), en el blanco se agregaron 20 μL de agua en vez de muestra y se procedió a medir la actividad PP1 como se describe en la sección 7.1. Para realizar una curva de inhibición con MCLR estándar, en lugar de la muestra, se agregaron 20 μL por pocillo de diluciones del estándar de MCLR (de 0,3 a 30 μM). La curva obtenida se graficó como Actividad de PP1 (%) *vs.* Log [MCLR], considerando solamente los puntos de la misma con $\text{CV} < 15\%$ (ver descripción en Actividad de PP1). La concentración de equivalentes de MCLR en cada muestra, se calculó, por interpolación en dicha curva.

En la figura 4 se muestra una curva de MCLR representativa de todas las obtenidas en esta tesis. A su vez, promediando los valores de CI_{50} de las curvas de calibración más confiables obtenidas ($n=6$), se calculó la CI_{50} promedio de la técnica, que resultó ser $1,47 \text{ nM} \pm 0,3$ (media \pm EE), valor que se encuentra dentro del intervalo de referencia descrito por Heresztyn y Nicholson, (2001) para inhibición *in vitro* de PP1 por MCLR (de 0,8 a 38 nM), pero que resulta mayor que el descrito por Wiegand y Pflugmacher, 2005 (CI_{50} entre 0,1-0,25 nM).

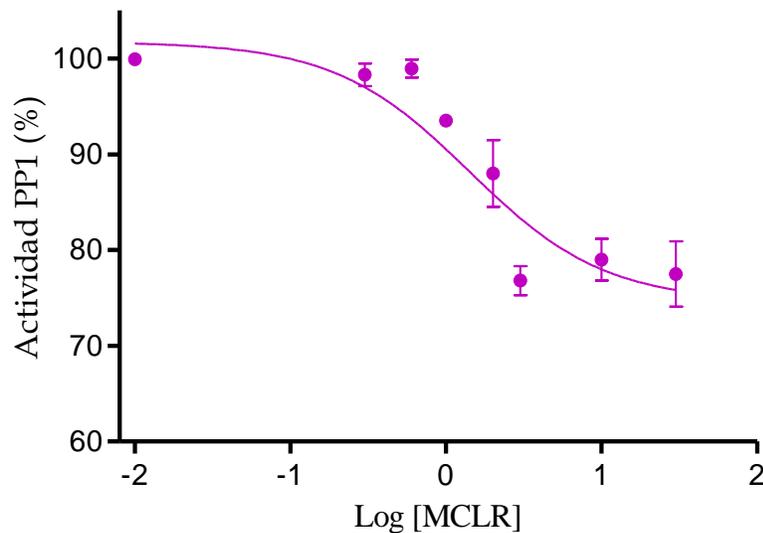


Figura 4. Curva representativa de la actividad de la enzima PP1 en presencia de MCLR, $n=4$.

8. 2 Ensayo inmunoenzimático (ELISA):

Esta técnica se utilizó para cuantificar MCLR extraíble por metanol contenida en cultivos de *M. aeruginosa* y para corroborar las concentraciones de los extracto metanólicos de floraciones naturales, extraídos en Uruguay. Como guía para su desarrollo se utilizó el protocolo desarrollado en el laboratorio de la Dra. Beatriz Brena, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Para esta técnica se prepararon las siguientes soluciones:

- Diluciones de estándar de MCLR (de 0,2 a 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$).
- Buffer PBS-BSA 0,1%.
- Solución de anticuerpo policlonal de conejo: formada por 1,34 mL de buffer de interferencias 10X con 6 mL de solución de anticuerpo policlonal de conejo anti-MCLR.
- Solución de lavado: PBS (buffer fosfato salino, pH 7)-Tween 20 0,05%.
- Solución inmunoglobulina anti conejo-peroxidasa.

- Solución sustrato: formada por 200 μL TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina) 0,6% m/v en DMSO, 50 μL H_2O_2 1% y 12,5 mL buffer acetato 1 M, pH 5,5.
- Ácido sulfúrico 2N.

Con los reactivos a temperatura ambiente, se colocaron 50 μL por pocillo de las diluciones de estándar de MCLR y de las muestras en una placa de 96 pocillos sensibilizada con antígenos. Luego de evaporar el metanol por pasaje de N_2 , se resuspendió las muestras en agua bidestilada. De cada una, se realizaron diluciones seriadas (1/2, 1/50, 1/100, 1/1000, etc.) en PBS-BSA 0,1%. Se sembró una solución de concentración de MCLR conocida (1 μg MCLR L^{-1}), como "control". En el "blanco" se sembraron 100 μL de buffer PBS-BSA 0,1% y para los pocillos "cero" se sembraron 50 μL del mismo buffer. Se realizaron triplicados de cada solución. Luego se sembraron 60 μL de solución de anticuerpo policlonal de conejo anti-MCLR en todos los pocillos salvo en los pocillos destinados a blanco. Se incubó a temperatura ambiente durante 50 minutos, con agitación continua. Transcurrida la incubación se lavó la microplaca 4 veces, con solución de lavado. Se secó golpeando enérgicamente la microplaca boca abajo sobre papel absorbente y se agregaron 100 μL por pocillo de solución de inmunoglobulina anti conejo-peroxidasa. Se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente, con agitación constante y luego se lavó con solución de lavado, repitiendo 7 veces. Se secó, se agregaron 100 μL de solución sustrato por pocillo y se incubó la microplaca protegida de la luz, durante 5-20 minutos, para permitir el desarrollo de la reacción de la peroxidasa con la solución sustrato. Esta reacción se detuvo agregando 50 μL de ácido sulfúrico 2N por pocillo.

En esta técnica, las muestras que tuvieran MCLR provocarían interferencias en la unión de los anticuerpos anti-MCLR con los antígenos de la microplaca sensibilizada (ELISA de competición) por lo que en los sucesivos lavados, los anticuerpos unidos a la MCLR de la muestra se perderían, imposibilitando la unión posterior del anticuerpo secundario unido a peroxidasa. Es decir, a mayor

concentración de MCLR en la muestra, menor color de reacción por pocillo. El color de reacción se midió por absorbancia a 450 y 620 nm. Se calculó el CV (%) entre triplicados y solo se consideraron las muestras que no superaran el 15% de CV. Para realizar una curva de calibración, se graficó absorbancia *vs.* Ln [MCLR]. La cuantificación de las muestras sólo fue posible cuando la absorbancia de las mismas cayó dentro de la curva. Para comparar entre distintas corridas de medición, se ajustaron los valores de absorbancia (de muestras y curva estándar) mediante normalización con la absorbancia del cero.

8.3 Cuantificación de MCLR total mediante la detección de MMPB:

Las MC, debido a su peso molecular son de baja volatilidad y no pueden inyectarse directamente en el cromatógrafo gaseoso. Es por ello que se requiere un paso previo, una oxidación fuerte, que convierta MC en MMPB, producto volátil y que no se encuentra en la naturaleza. Esta oxidación puede realizarse con ozono o con oxidantes fuertes como permanganato y periodato (oxidación de Lemieux).

Oxidación de Lemieux: se utilizó esta técnica siguiendo los protocolos de Sano et al. (1992), Williams et al. (1997a) y Ardanaz (2010), en muestras de tejido de *O. hatcheri*. Por cada gramo de tejido se agregaron 8 mL de solución oxidante (5,7 mg de KMnO_4 y 318,6 mg KIO_4 en 16 mL de agua destilada) y 23 mg de Na_2CO_3 . La reacción se llevó a cabo durante toda la noche, manteniendo el pH en 9 y el color de la solución púrpura, por agregado de Na_2CO_3 y $\text{KMnO}_4/\text{NaIO}_4$ cuando era necesario. Luego, para reducir el exceso de oxidante, se agregaron unas gotas de metabisulfito de sodio 20% y la débil reacción alcalina, se acidificó con gotas de H_2SO_4 10%. Para extraer el MMPB se utilizó una técnica de extracción líquido-líquido con dietil-éter (4 x 15 mL por gramo de tejido). Se colectaron las fracciones de éter y se extrajo el agua con Na_2SO_4 anhidro.

Cromatografía gaseosa con espectrometría de masas (CG/EM): El análisis de CG/EM capilar se realizó en un equipo Agilent 6890 vinculado a un espectrómetro de masa Agilent 5973 con ionización por impacto electrónico en modo SIM. La

columna HP-5 MS (revestimiento de 0,25 μm , 0,25 mm i.d. x 30 m; Agilent 19091S-433) se usó con gas helio como soporte (flujo, 24,4 cm s^{-1}), presión constante, y 12 μs . La tasa de programa para *PTV Inlet* fue 80°C (0,00 minutos), luego 720 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (0,00 minutos) a 250 $^{\circ}\text{C}$ (2,00 minutos), modo *splitless* de inyección. La tasa de programa de análisis fue 75°C (0,00 minutos) tiempo inicial, 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ a 200 $^{\circ}\text{C}$ (0,00 minutos) en 35 min tiempo total. Las demás condiciones fueron: fuente de iones, 230 $^{\circ}\text{C}$; temperatura cuadrupolo, 150 $^{\circ}\text{C}$; interfase, 280 $^{\circ}\text{C}$; volumen de inyección, 3 μL .

El MMPB se detectó a los 15,659 minutos. La autenticidad de este compuesto se confirmó por el análisis de los fragmentos iónicos característicos de acuerdo a Williams et al. (1997a). Se cuantificó usando una curva de calibración realizada con diluciones de MCLR estándar sometida a oxidación de Lemieux. El límite de detección que dio una calibración consistente fue menor que 0,2 ng de MMPB. En las figuras 5a-c se muestran la curva de calibración junto con los picos del cromatograma del estándar y de una muestra de hígado.

Para calibrar la técnica se prepararon 3 *spikes* con muestras de hígado de peces sanos, a las que se les agregó una cantidad conocida de estándar. Luego se los sometió a oxidación de Lemieux y CG/EM. El porcentaje de recuperación de estos *spikes* fue de $67,25 \pm 26 \%$, valor con el que se ajustó el análisis de las muestras.

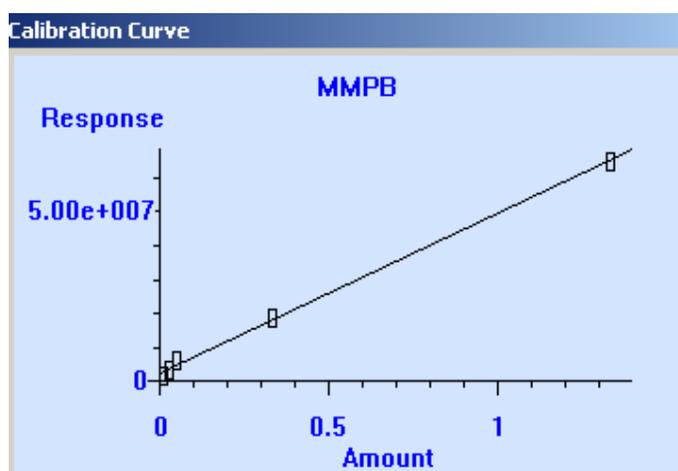


Figura 5.a. Curva de calibración de MMPB

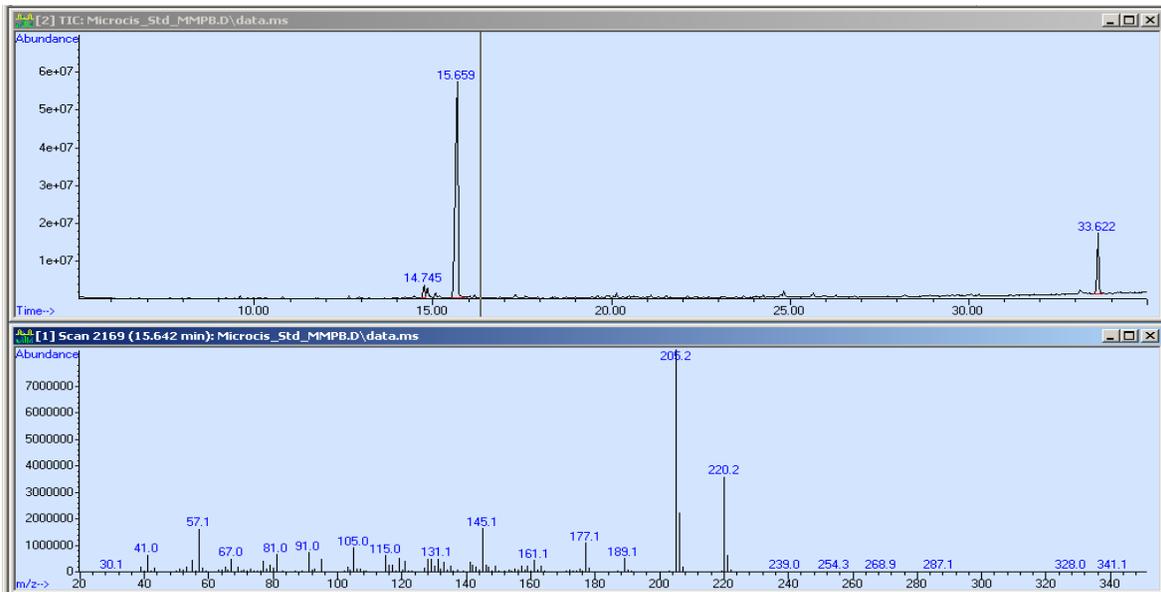


Figura 5. b. Pico de MMPB (de MCLR estándar oxidada) y fragmentos iónicos característicos.

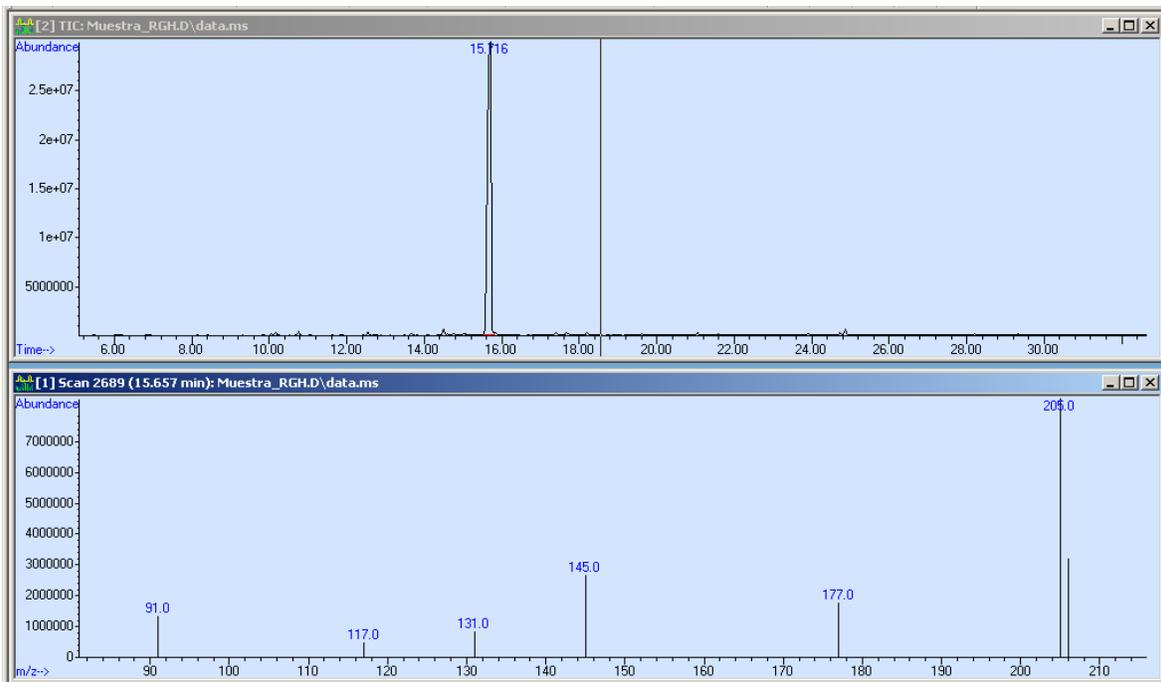


Figura 5. c. Pico de MMPB en muestra de hígado con sus fragmentos iónicos característicos.

9. Técnicas *ex vivo* para estudio de transporte intestinal (capítulo II)

Para estudiar el transporte y metabolismo de un determinado compuesto en el intestino, en general se utilizan técnicas *in vivo*, con la totalidad del animal; *in*

situ, donde se perfunde el intestino directamente sobre el animal anestesiado; *ex vivo* con órgano o tejido intacto; comprende intestino perfundido, sacos intestinales, cámara de Ussing, biopsias, entre otras, o *in vitro* con cultivos de células primarias, líneas celulares o fracciones subcelulares. Todas estas técnicas permiten contar con valiosa información referida a la absorción y metabolismo a nivel intestinal, y cada una presenta ventajas y desventajas (van de Kerkhof, 2007).

En esta tesis se utilizaron técnicas *ex vivo* mediante la preparación de sacos intestinales evertidos y no-evertidos, tiras intestinales y segmentos evertidos. A pesar de que los modelos *ex vivo* no reflejan en su totalidad lo que ocurre *in vivo*, resultan de gran utilidad para responder preguntas específicas, bajo condiciones de estudio más controladas con respecto a un *in vivo*. Estas técnicas se aplicaron en las distintas secciones del intestino de *O. mykiss* y *O. hatcheri* para evaluar el transporte de MCLR.

9.1 Sacos y tiras intestinales

Luego de 24 h de ayuno, los peces fueron sacrificados por decapitación y ruptura del centro nervioso. Se removió el intestino, descartando la sección de ciegos pilóricos (en *O. mykiss*) y el esófago y la válvula intestinal, en *O. hatcheri*. Las secciones media y posterior del intestino de *O. mykiss* y anterior, media y posterior del intestino de *O. hatcheri*, fueron seleccionadas para los experimentos de transporte (fig. 6). Sólo se trabajó con estas partes del intestino porque la anatomía de las mismas resultó adecuada al diseño experimental. Cada sección de intestino se colocó inmediatamente en solución salina Cortland (Anexo I, Tabla 2, pág. 193) en frío y se eliminó cuidadosamente el contenido intestinal. Se utilizaron porciones de aproximadamente 15 mm de longitud de estas secciones intestinales para la preparación de tiras, segmentos evertidos y sacos intestinales.

Para preparar sacos intestinales evertidos, se introdujo una aguja de crochet en la porción de intestino, se sujetó con hilo por el extremo superior de la aguja y, con suave presión desde el extremo libre hacia el extremo atado, se deslizó la

porción de intestino sobre sí misma, dejando de esta forma la mucosa intestinal expuesta. Una vez evertido, se pesó y se cerró sujetando con hilo por ambos extremos, insertando una cánula de teflón en uno de ellos para poder aplicar solución salina en el interior ($63 \pm 4,6 \mu\text{L}$) con una jeringa Hamilton. Los sacos intestinales no-evertidos, se ataron y llenaron directamente (fig. 7). Estas preparaciones fueron usadas para medir los flujos de transporte desde el espacio intracelular hacia el lumen intestinal (transporte apical) y desde el espacio intracelular hacia el lado serosal de la pared intestinal (transporte basolateral), respectivamente.

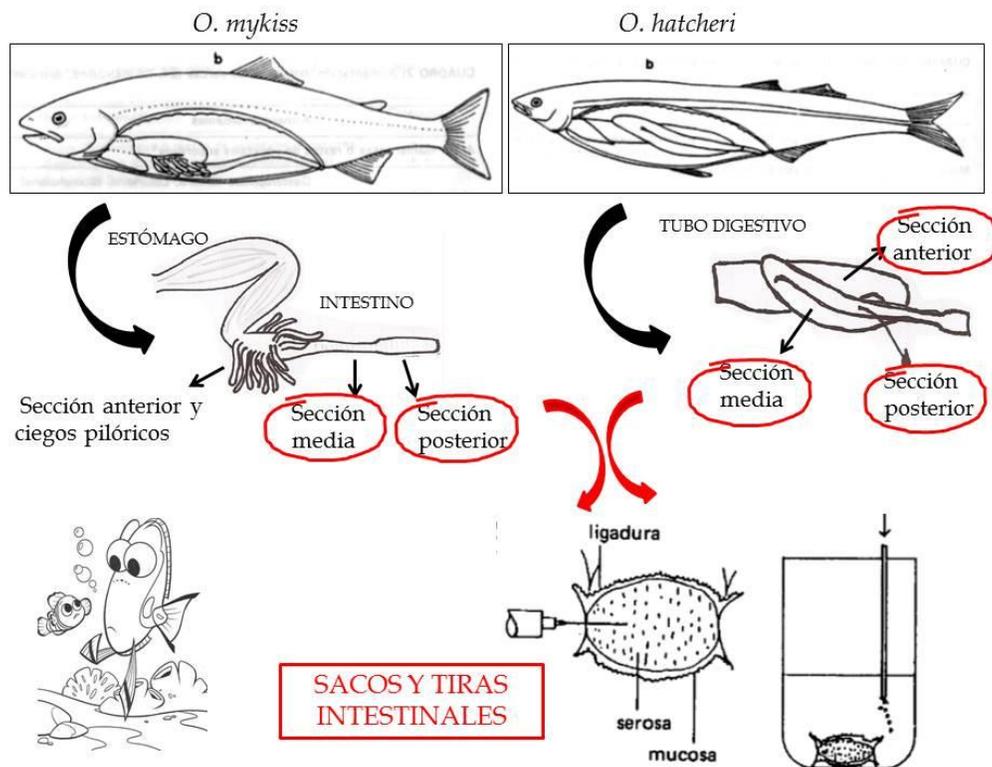


Figura 6. Esquema de las secciones intestinales utilizadas para realizar sacos y tiras intestinales.

En algunos experimentos resultó conveniente utilizar tiras longitudinales de intestino. En este caso se utilizaron sólo porciones de la sección media del intestino, tanto en *O. hatcheri* como en *O. mykiss*. Cada tira se pesó y colocó al azar en un tubo de vidrio o de microcentrífuga. Este tipo de preparaciones resultó útil

para trabajar con volúmenes pequeños, reduciendo la cantidad de reactivos necesarios y permitió aplicar hasta seis tratamientos más dos controles sobre el intestino de un mismo individuo, reduciendo el número de individuos por experimento. Los resultados obtenidos con tiras intestinales reflejaron la suma de los flujos basolateral y apical.

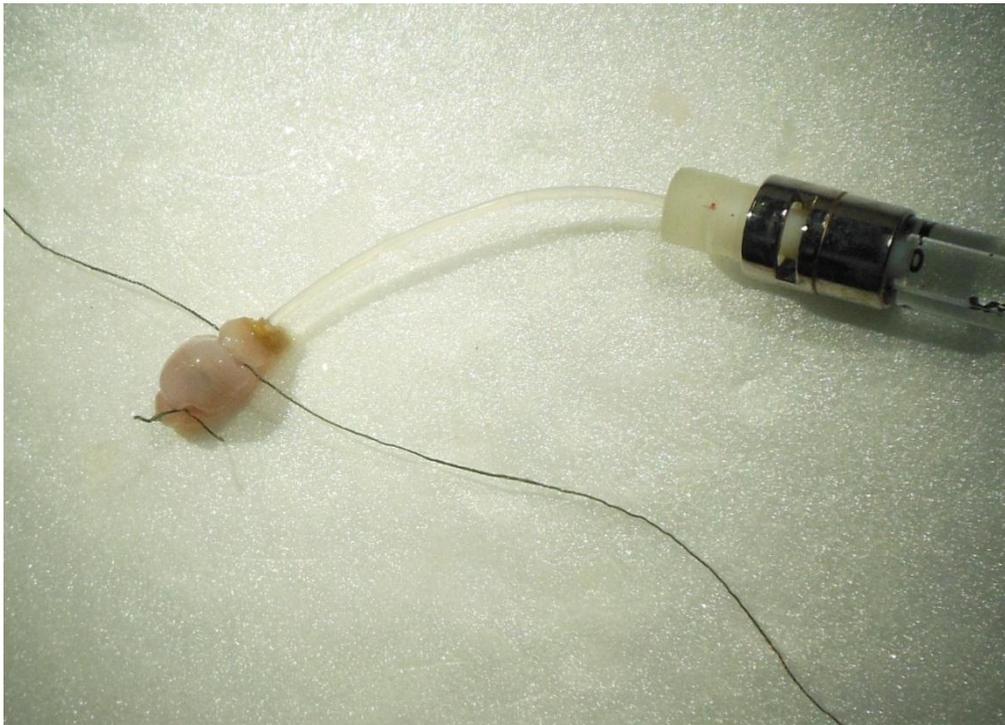


Figura 7. Saco intestinal no-evertido.

9.2 Calibración de la técnica de CDNB

Para medir la actividad de transportadores tipo Abcc se utilizó CDNB, compuesto descrito como sustrato específico de dichos transportadores en mamíferos (Evers et al., 2000; Gotoh et al., 2000, Mottino et al., 2001) y en el condricio *Raja erinacea* (Rebbeer et al., 2000). El CDNB es permeable a la membrana celular y una vez dentro de la célula es conjugado con GSH, en una reacción catalizada por GST. El producto resultante de la conjugación, 2,4-dinitrofenil-S-glutación (DNP-SG), es eliminado a través de Abcc (estos transportadores se describen en detalle en el capítulo II).

Para desarrollar la técnica de transporte con CDNB, se utilizaron como referencia los experimentos descritos por Gotoh et al. (2000), Mottino et al. (2000) y Villanueva et al. (2005). Como primer paso, se determinó la concentración más adecuada de CDNB a utilizar. Para ello se prepararon sacos intestinales con porciones de las secciones media y posterior del intestino *O. mykiss* y se incubaron en 5 mL de solución salina (baño) con: 0, 50, 100 ó 200 μM CDNB, concentración final (el CDNB se disolvió previamente en DMSO como solución madre de 200 mM; este solvente siempre estuvo a una concentración $< 0,1\%$ en el baño de incubación de cada saco intestinal). Se registró la absorbancia a 340 nm (longitud de onda en la cual se detecta DNP-SG), cada 10 minutos. De la misma forma se registró la absorbancia de las soluciones empleadas pero sin preparados de intestino (blanco de soluciones) y de sacos intestinales en solución salina sin CDNB (blanco de tejido).

En los baños de los sacos intestinales incubados con distintas concentraciones de CDNB, se observó un incremento en la absorbancia a lo largo del tiempo, que fue bastante lineal durante la primera hora, siendo mayores las lecturas en las concentraciones altas de CDNB. Mediante los blancos de solución se comprobó que el CDNB no se modificaba espontáneamente, mientras que los blancos de tejido producían lecturas a 340 nm, que aumentaban en el tiempo. No se pudo definir el origen de esas lecturas, aunque eran bajas comparadas con las obtenidas por DNP-SG, y para la concentración de 200 μM CDNB, el error causado por esta interferencia resultó despreciable. A partir de estos resultados preliminares se fijaron un tiempo de una hora y una concentración de 200 μM CDNB como condiciones óptimas para estos experimentos.

Por último, para confirmar que el producto medido fuera DNP-SG y para detectar la presencia de metabolitos subsecuentes, 6 muestras de baños de preparaciones de *O. mykiss* y 6 de *O. hatcheri* (3 de sacos evertidos y 3 de no-evertidos) y 3 muestras de tejido por cada especie, se prepararon para análisis por HPLC. Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Silvina S.M. Villanueva,

en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) de la Universidad Nacional de Rosario. Para ello, a cada muestra se le agregaron $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ de HClO_4 70 % y se centrifugó a $3500 \times g$ durante 5 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se inyectaron en un equipo Waters M-6000 HPLC (Waters, Milford, MA). Se trabajó en condiciones de elución isocrática con columna C18 de $5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, CA), con la fase móvil de acetonitrilo: 0,01% H_3PO_4 (1:3, v/v), a una velocidad de flujo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ (Hinchman et al., 1991). El DNP-SG se detectó a 365 nm y se cuantificó mediante el método de estándar externo, tomando la altura de cada pico (fig. 8). De esta forma se pudo comprobar la formación de DNP-SG, y corroborar que no se producían metabolitos secundarios producto de la degradación enzimática de dicho compuesto.

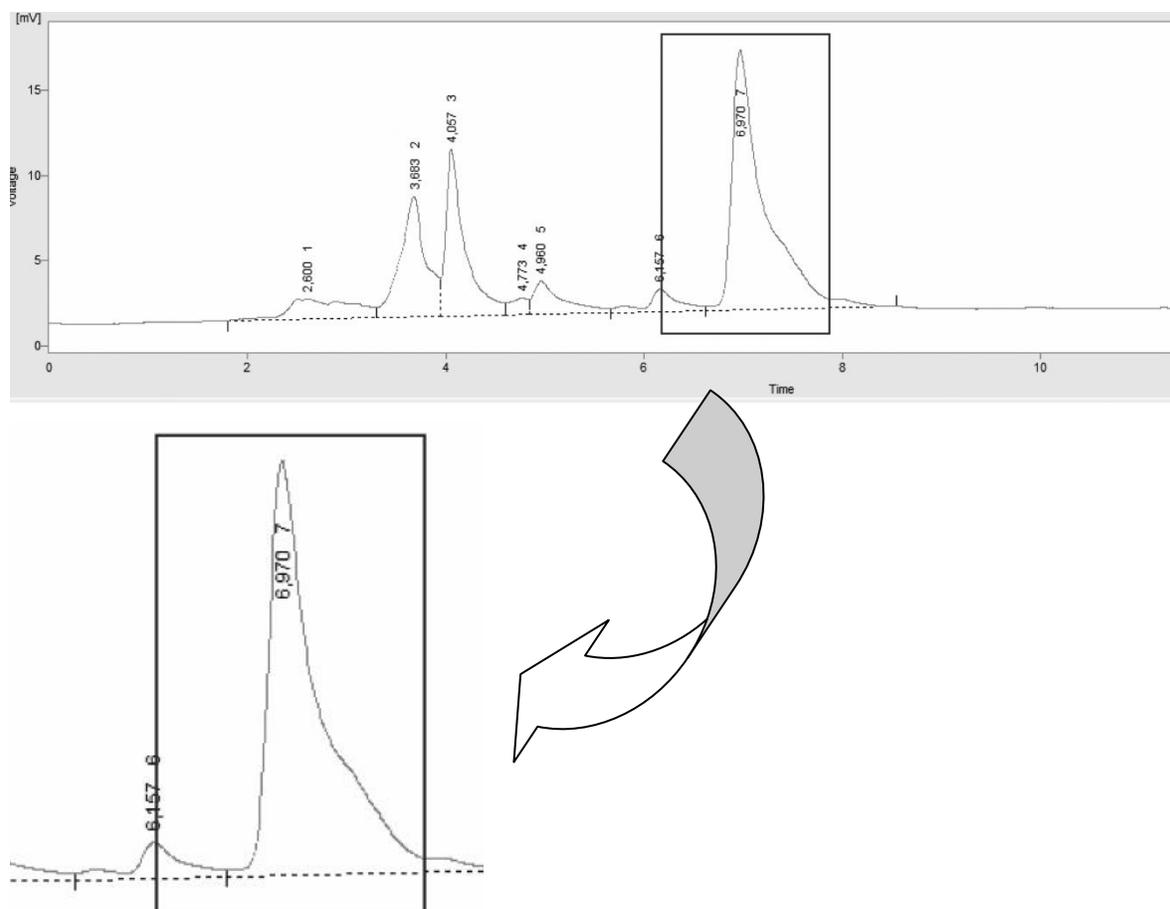


Figura 8. Pico de DNP-SG detectado a los 7 minutos por HPLC.

9.3 Calibración de la técnica de calceína-AM:

La calceína-AM es un compuesto lipofílico no fluorescente, capaz de atravesar las membranas celulares. Una vez dentro de la célula este compuesto es atacado por esterasas, que hidrolizan la unión éster, dando como resultado calceína (fluorescente). En la forma no fluorescente (calceína-AM) se elimina mediante actividad de los transportadores Abcb1, mientras que en su forma fluorescente (calceína) es eliminado por Abcc (Evers et al., 2000; Takano et al., 2006; Luckenbach et al., 2014).

Para estudiar el transporte intestinal con calceína, se utilizaron tiras intestinales de la sección media de intestino de *O. mykiss* y *O. hatcheri*, las cuales se colocaron en tubos de microcentrífuga con baños de solución salina de 300 μ L, con calceína-AM a una concentración final de 0,25 μ M (Zaja et al., 2008) (disuelta previamente en DMSO a 0,25 mM, resultando la concentración de dicho solvente de 0,1% en los baños de incubación de cada tira intestinal). Luego, a lo largo de una hora, se tomaron alícuotas de 200 μ L de cada baño y se leyó la fluorescencia (calceína) en un fluorómetro Qubit (Invitrogen-Molecular Probes, Oregon) a 485/530 nm longitudes de onda de excitación/emisión. Una vez obtenida la lectura, las alícuotas fueron inmediatamente devueltas a cada baño para mantener volúmenes constantes. Los tubos fueron protegidos de la luz durante todo el experimento. La tasa de transporte de calceína, se calculó como unidades de fluorescencia por minuto, y se refirió a la masa de tejido. Como blanco de solución se tomaron lecturas del líquido sin tejido y también se realizaron blancos de tejido, con tiras intestinales incubadas solamente en solución salina. En ambos tipos de preparación se controló si aparecía fluorescencia a lo largo del tiempo. Los resultados mostraron que estas preparaciones no daban lecturas en la fluorescencia de calceína o bien presentaban valores muy bajos respecto de las muestras, sin que alteraran los resultados de los experimentos.

10. Técnicas histológicas y de histoquímica (capítulo III)

Para detectar la presencia de transportadores ABC y evaluar aspectos tóxicos de MCLR a nivel de tejido, se realizaron preparaciones histológicas de intestino de *O. hatcheri*. Para esto se tomaron porciones de intestino (de las secciones anterior, media y posterior), de 5 mm aproximadamente, las cuales fueron inmediatamente fijadas en Bouin durante 1 hora a 4°C y luego 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente, se aclararon con butanol e incluyeron en parafina, respetando los siguientes tiempos de incubación: alcohol 70 (12 horas), alcohol 80 (1 hora), alcohol 90 (1 hora), alcohol 96 (1 hora), alcohol 100 (1 hora), butanol (2 horas), butanol-parafina (50/50) (3 horas a 58 °C), parafina 1 (3 horas a 58 °C), parafina 2 (12 horas a 58 °C). Se confeccionaron los tacos en moldes metálicos y se dejaron enfriar en heladera. De los tacos resultantes, se obtuvieron cortes de 4 µM con un micrótopo rotatorio (Leica) y se montaron en portaobjetos. Estos cortes de intestino de *O. hatcheri* se utilizaron para aplicar técnicas de lectin- e inmunohistoquímica, en el laboratorio de Biología del desarrollo, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencia (IFIBYNE)-CONICET-UBA.

10.1 Lectina-histoquímica:

Las técnicas de lectina-histoquímica permiten evidenciar la presencia y distribución de glicoconjugados específicos, tanto en tejidos normales como en patológicos. Se basan en el uso de lectinas, definidas como un grupo heterogéneo de proteínas o glicoproteínas de origen animal o vegetal, que tienen la propiedad de reconocer y unirse con alta especificidad y en forma reversible a hidratos de carbono terminales o a moléculas de hidratos de carbono incluidas en glicoconjugados complejos (Spicer y Schulte, 1992; Genten et al., 2009).

Para esta técnica, se desparafinó e hidrató cada corte histológico en alcoholes de graduación creciente y PBS mediante los siguientes pasos: incubación en estufa de cultivo a 65°C (7 minutos), xilol I (15 minutos), xilol II (15 minutos),

alcohol 100 (5 minutos), alcohol 95 (5 minutos), alcohol 90 (5 minutos), alcohol 70 (5 minutos), PBS. Luego se incubaron con distintas combinaciones de lectinas (descripción en capítulo III). Para las incubaciones se trabajó en cámaras húmedas (placas de Petri cubiertas en su interior con papel absorbente humedecido con agua destilada), protegidas de la luz con papel aluminio. Una vez incubadas las lectinas, se realizó un montaje con glicerol-PBS (50/50) y se observó y fotografió cada corte en microscopio confocal Olympus Fluoview y con el software Fluoview V 5.0.

10.2 Inmunohistoquímica:

Esta técnica se basa en la especificidad de unión antígeno-anticuerpo y en esta tesis se utilizó para localizar transportadores de la superfamilia ABC. Para esto, luego de desparafinar e hidratar cortes histológicos de intestino (de igual manera que lo descrito para lectinas), se realizó el bloqueo de las peroxidasas endógenas del tejido (incubando con solución de H₂O₂ 5% durante 5 minutos a temperatura ambiente). Luego de lavar en PBS se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente con solución Blotto (5% de leche descremada en polvo en PBS) con el fin de bloquear sitios inespecíficos de unión para los anticuerpos (AC). Se eliminó dicha solución de los cortes sin lavar y se agregaron distintos anticuerpos primarios: anti-ABCB1 (Pgp), -ABCC2 (MRP2), -ABCC4 (MRP4) o -ABCG2 (BCRP). Luego de incubar 12 horas en cámara húmeda y a 4°C, se realizaron lavados y se aplicaron los AC secundarios biotinilados correspondientes, con los cuales se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se lavó en PBS y luego, para la amplificación y detección de la marca, se agregó estreptavidina unida a peroxidasa, con la cual se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las moléculas de estreptavidina se unen fuertemente con la biotina adosada a los AC secundarios. Para el revelado se usó solución del complejo 3,3'-diaminobencidina (DAB) (1 mL buffer 0,05 M Tris-HCl pH 7,6 + 1 gota de 0,02% DAB + 20 µL H₂O₂ de 30 vol.) aplicada en forma de gotas

sobre el corte bajo microscopio óptico. El DAB es un cromógeno de gran especificidad para la peroxidasa, que revela indirectamente el AC aplicado. A los 10-20 segundos, la reacción se detuvo colocando cada porta en un coplin con agua corriente. Por último, se realizó una coloración rápida de Hematoxilina-Eosina (H-E), deshidratación en alcoholes de graduación creciente, aclaramiento en xilol y se montó cada porta con bálsamo sintético. Cada corte se observó y fotografió con un microscopio óptico de campo claro (Olympus) o microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TiS).

Como controles negativos, se realizaron cortes donde se omitió el agregado del AC primario, colocando en su lugar unas gotas de PBS. El resto de los pasos fueron iguales a lo descrito anteriormente.

11. Análisis gráfico y estadístico

Todos los datos a lo largo de la tesis se presentan como media \pm error estándar. Se utilizaron los siguientes programas: Graph Pad Prism v.5, Statistica 7, Microsoft Excel. Los libros Zar (1999) y Fowler et al. (1998) fueron utilizados como bibliografía de referencia. Los análisis estadísticos utilizados en los distintos capítulos, se detallan en las secciones de metodología de los mismos.

CAPÍTULO I

Efectos tóxicos y acumulación de microcistina-LR en tejidos de *Odontesthes* *hatcheri*

INTRODUCCIÓN

Los organismos acuáticos son los primeros en estar expuestos a las cianotoxinas y el sistema gastrointestinal es una de las principales vías de intoxicación. En condiciones naturales, numerosas especies de invertebrados y peces se alimentan de cianobacterias. *O. hatcheri* se encuentra en ambientes, donde coexiste con frecuentes floraciones de cianobacterias. Aunque se desconoce si las ingiere como parte de su dieta o de manera accidental, se ha descrito la presencia de células de cianobacterias en el tracto intestinal de esta especie (Hualde et al., 2011). Teniendo en cuenta que el riesgo de incorporar cianotoxinas como MCLR dependería en gran parte de la digestión de las cianobacterias seguida de la absorción de la toxina, en este capítulo se estudió la capacidad de *O. hatcheri* de digerir la pared de células de *Microcystis aeruginosa* y se evaluaron la acumulación de MCLR y los efectos tóxicos provocados por la misma.

Efectos tóxicos de las microcistinas

El principal efecto tóxico de las MC, es la inhibición de las proteínas fosfatasas (PP) 1 y 2A. Entre estas enzimas PP2A es más sensible a MCLR que PP1 (Heresztyn y Nicholson, 2001; Wiegand y Pflugmacher, 2005). La inhibición de PP se produce cuando el residuo cisteína 273 de la subunidad catalítica de la enzima PP1 o PP2A interactúa con el grupo carbonilo del residuo Mdha de la molécula de MC, sin ser necesaria una unión covalente para que ocurra la inhibición. La introducción del grupo Adda en la parte hidrofóbica del sitio catalítico de la enzima es lo que produce su inactivación (Dawson, 1998). Se ha detectado que esta interacción consta de una primera etapa, donde ocurre la unión rápida y reversible de una molécula de MC con una de PP, hecho que conduce a la inhibición de la actividad catalítica. Luego, en una segunda etapa, que puede tardar horas, se establece un enlace covalente entre el residuo de Mdha de la MC y las posiciones

nucleofílicas de las enzimas, llegándose a una inactivación irreversible de PP (Honkanen et al., 1990; MacKintosh, et al., 1995; Runnegar et al., 1995; Craig et al., 1996; Williams et al., 1997a).

En casos de intoxicación aguda por MC en mamíferos, la hiperfosforilación de las proteínas lleva a la disrupción del citoesqueleto hepático, causando hemorragias masivas en dicho órgano, necrosis, destrucción sinusoidal y, eventualmente, la muerte por shock hemodinámico (Kondo et al., 1992; Hooser et al., 2000). En una intoxicación crónica, las MC pueden causar daño en la organización tisular hepática y se describen como promotoras de cáncer hepático y compuestos genotóxicos (Hooser et al., 1989; Carmichael, 1992; Falconer et al., 1992; Kuiper-Goodman et al., 1999; Campos y Vasconcelos, 2010). Este tipo de daño también se ha observado en el glomérulo y en células de los túbulos proximales del riñón, que también ha sido descrito como órgano blanco de las MC (Eriksson et al., 1990; 1992; MacKintosh et al., 1990). También se han descrito efectos deletéreos en pulmones, corazón e intestino (Hooser et al., 1990; Ito et al., 2000).

Otro efecto tóxico importante causado por las MC, tanto en mamíferos como en organismos acuáticos, es el estrés oxidativo (revisión de Amado y Monserrat 2010). La definición clásica de estrés oxidativo hace referencia al desequilibrio entre moléculas pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar o neutralizar dichas especies químicas. La diferencia a favor de los pro-oxidantes representa un potencial daño molecular y celular. Una definición más amplia define estrés oxidativo como la disrupción del control y la señalización redox (Amado y Monserrat 2010; Sabatini, 2010). La toxicidad de las MC se relaciona con la producción de radicales libres de oxígeno (ROS), especies químicas extremadamente inestables, que atacan a distintos tipos de macromoléculas causando peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, daño a ADN, daño mitocondrial, alteraciones del sistema de defensa antioxidante y alteraciones en los niveles de GSH intracelular, entre otros efectos (Li et al., 2003; Vinagre et al., 2003;

Pinho et al., 2003; Jos et al., 2005; Cazenave et al., 2006; Zhang et al., 2007; Prieto et al., 2008). Los mecanismos de defensa frente a los ROS pueden ser de dos tipos: enzimáticos (GST, CAT, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, entre otras enzimas) y no enzimáticos (GSH, tocoferol, ascorbato, etc.).

Según Amado y Monserrat (2010) el estrés y daño oxidativo causado por las MC sería producto de:

- ✓ La disminución de la reserva intracelular de GSH: La captación de la toxina involucraría un contra-transporte con GSH a través de transportadores biliares (Oatp) y, a su vez, la MC es conjugada con GSH para su detoxificación, por lo que la reserva celular de GSH se vería disminuida, alterando a su vez la capacidad de defensa frente a otras moléculas oxidantes exógenas o propias del metabolismo celular. Por otro lado, al inhibir a las PP, se ha visto que la enzima clave en la producción de GSH, la glutamato cisteína ligasa (GCL), queda en su estado fosforilado, forma en la que es menos activa, llevando a un mayor descenso en la reserva de GSH.
- ✓ La desorganización de la cadena de transporte de electrones mitocondrial: Se ha sugerido que las MC provocan este desacople, favoreciendo, en consecuencia, la aparición de ROS, disminuyendo la producción de ATP y afectando, por lo tanto, procesos como la síntesis *de novo* de GSH.
- ✓ Debido a que varias enzimas antioxidantes son reguladas por procesos postraduccionales, como la fosforilación, el efecto inhibitorio de MC sobre las PP, alteraría las defensas celulares.

Por último, las MC, al provocar estrés oxidativo, desencadenarían la despolarización de la membrana mitocondrial, afectando la permeabilidad mitocondrial, lo que liberaría citocromo c, molécula que inicia la vía de señalización apoptótica. También se ha visto que la subunidad β de la ATP-sintasa sería blanco de MCLR y este efecto podría promover la señalización apoptótica mitocondrial, aunque solamente se ha observado esta respuesta a altas

concentraciones celulares de toxina (Mikhailov et al., 2003). Otras proteínas y factores de transcripción afectados por MC se detallan en la revisión de Campos y Vasconcelos (2010).

En peces, el hígado es considerado el principal órgano blanco de MC, al igual que en mamíferos, aunque los efectos tóxicos de estos compuestos también han sido descritos en riñón, branquias, tracto digestivo y cerebro (Kotak et al., 1996; Fisher and Dietrich, 2000; Cazenave et al., 2005, 2006; Molina et al., 2005; Prieto et al., 2008). En concordancia, varios autores han detectado MC acumulada en hígado, intestino, riñón, músculo, vesícula biliar y sangre de distintas especies de peces (Williams et al., 1995, 1997a,b; Sahin et al., 1996; Tencalla y Dietrich, 1997; Bury et al., 1998; Magalhães et al., 2003; Xie et al., 2004, 2005; Cazenave et al., 2005; Smith y Haney, 2006). Al igual que en mamíferos, se ha observado que en los peces, las MC producen inhibición de PP1 y PP2A *in vivo* e *in vitro* (Tencalla y Dietrich, 1997; Runnegar et al., 1999) y estrés y daño oxidativo (Li et al., 2003; Jos et al., 2005; Cazenave et al., 2006). El hígado y el riñón son los órganos más afectados y, al igual que en mamíferos, sufren desintegración tisular y disfunción. En mamíferos el síntoma más notorio en el hígado es la hemorragia, con muerte causada por shock hipovolémico, mientras que en peces se observa mayormente una necrosis masiva del hígado (Råberg et al., 1991; Carbis et al., 1996). En estudios con líneas celulares de mamíferos y peces, también se describe daño lisosomal como uno de los efectos tempranos en la intoxicación con MCLR (Boaru et al., 2006) Otros efectos tóxicos de MC registrados en peces son: degeneración y necrosis de células del epitelio branquial y otros efectos histopatológicos en órganos como riñón e intestino; alteraciones de parámetros hematológicos, de la regulación iónica y balance osmótico; alteraciones cardíacas y respiratorias; cambios de comportamiento y de la actividad locomotora, etc. (revisiones de Malbrouck y Ketesmont, 2006; Wiegand y Pflugmacher, 2005; Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011).

Consumo de cianobacterias y resistencia a cianotoxinas

Las cianobacterias constituyen una parte importante en la dieta de muchos animales acuáticos tales como zooplancton, bivalvos y peces fitoplanctófagos (Bastviken et al., 1998; Ferrão-Filho et al., 2002; Dionisio Pires et al., 2004; Xie et al., 2004, 2005). En el caso de los peces, numerosos trabajos afirman que la piel y las branquias formarían una barrera contra MC (Tencalla et al., 1994; Bury et al., 1995), por lo que la ingestión sería la principal vía de intoxicación (Bury et al., 1998; Malbrouck y Kestemont, 2006). No obstante, otros autores sugieren que algunas MC podrían ingresar a través del epitelio branquial (Cazenave et al., 2005).

Mientras que algunas especies de invertebrados y peces son capaces de distinguir la presencia de cianobacterias tóxicas y evitar el consumo de las mismas, al menos cuando otras fuentes de alimento son accesibles; otras especies consumen activamente cianobacterias tóxicas sin sufrir efectos negativos. Entre los organismos capaces de distinguir y evitar el consumo de cianobacterias tóxicas se encuentran, por ejemplo, dos representantes del zooplancton: el misidáceo *Mysis mixta* y el copépodo *Eurytemora affinis* (Engström-Öst, 2002). Otros copépodos como *Acartia bifilosa* no discriminan entre cianobacterias tóxicas u otro tipo de alimento (Engström-Öst, 2002). Entre las especies que consumen activamente cianobacterias, se encuentran *Daphnia magna* (Schwarzenberger et al., 2014), el mejillón *Dreissena polymorpha* (Dionisio Pires et al., 2004) y la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*). Esta última es una especie que vive en ambientes donde ocurren frecuentes floraciones de cianobacterias y tolera la presencia de MC; incluso, debido a su gran resistencia a las cianotoxinas, ha sido utilizada para controlar floraciones tóxicas en lagos eutróficos (Xie et al., 2004; Zhang et al., 2007).

En los peces, las diferencias interespecíficas en cuanto a sensibilidad frente a las cianotoxinas han sido relacionadas con los distintos hábitos alimentarios; sin embargo, se observan discrepancias en la bibliografía al respecto. Por ejemplo, la carpa común (*Cyprinus carpio*) es más sensible que la trucha arco-iris (*O. mykiss*)

frente a MCLR, cuando la toxina es administrada forzosamente por vía oral (Fischer y Dietrich, 2000). Con una concentración de $1,7 \mu\text{g MCLR g}^{-1}$ masa corporal (mc), individuos de *C. carpio* presentaron daño hepático severo y se registraron casos de mortalidad, mientras que individuos de *O. mykiss* intoxicados con la misma concentración de MCLR no sufrieron efectos tóxicos. Sólo con una concentración de $6,6 \mu\text{gMCLR g}^{-1}$ mc, el daño hepático fue severo en ambas especies y se observaron casos de mortalidad tanto en *O. mykiss* como en *C. carpio*, resultando los efectos letales más tempranos en *C. carpio* (Fischer y Dietrich, 2000). Cuando ambas especies recibieron una concentración de $0,55 \mu\text{g MCLR g}^{-1}$ mc por vía intraperitoneal, dicha concentración tóxica resultó ser letal, tanto para *C. carpio* como para *O. mykiss*, indicando que la diferencia en sensibilidad entre estas especies se debería a diferencias en el sistema gastrointestinal. Según Fischer y Dietrich (2000), las características inherentes al sistema digestivo de cada especie estarían relacionadas con estas diferencias. Dado que *C. carpio* es una especie herbívora-omnívora, que posee un intestino largo en comparación con *O. mykiss* (especie carnívora), tendría mayor área de superficie para la absorción de MCLR (Bury et al., 1998; Fischer y Dietrich, 2000). Por el contrario y como se mencionó anteriormente, Xie et al. (2004) sugieren que la carpa plateada (*H. molitrix*), a pesar de ser una especie fitoplantófaga, es resistente a MCLR y RR. Según los autores, esta resistencia se debería a la capacidad de *H. molitrix* de degradar activamente MCLR durante la digestión y/o a la capacidad de bloquear la absorción intestinal de MCLR y de eliminar la MCRR absorbida.

Acumulación de microcistina en peces

En numerosos organismos acuáticos se estudió la acumulación de MCLR y otras variantes de MC (revisión de Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011). En lo que respecta a los peces, se describe acumulación de MC en diversos tejidos. Las mayores concentraciones se detectaron en hígado e intestino, seguidos del riñón,

bilis, sangre, gónadas, cerebro y músculo (Williams et al., 1997a; Malbrouck et al., 2003; Li et al., 2004; Soares et al., 2004; Xie et al., 2005; Sotton et al., 2012). También se encontró MC en cantidades sustanciales en heces de peces (Soares et al., 2004; Xie et al., 2005; Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011).

El análisis de acumulación de MC entre especies de peces sugiere que existen distintos patrones según el hábito trófico. En peces de agua dulce colectados a campo, Xie et al., (2005) detectaron mayores concentraciones de MCLR + RR acumuladas en músculo en *Culter ilishaeformis* (carnívoro) y en *Carassius auratus* (omnívoro) (2,22 y 1,96 $\mu\text{g MC g}^{-1}$ mts, respectivamente), en comparación con el fitoplanctófago *H. molitrix* y con el herbívoro *Parabramis pekinensis* (1,65 y 0,66 $\mu\text{g MC g}^{-1}$ mts, respectivamente), a pesar de que en el tracto intestinal de *H. molitrix*, la cantidad de MC fue de 6,5 $\mu\text{g MC g}^{-1}$ mts. Sin embargo, a pesar de que las mayores concentraciones de MCLR se encontraron en peces carnívoros, estas especies acumularían menor cantidad de MC que la dieta que consumen (revisión de Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011). Según la información analizada en esta revisión, es más común que ocurra biodilución a lo largo de la cadena trófica, con excepción de los peces zooplanctófagos, donde sí ocurriría biomagnificación (es decir, estos peces acumularían más MC que la acumulada en el zooplancton consumido).

Por otro lado, existen diferencias en la bibliografía en relación con las técnicas de medición utilizadas para determinar MC acumulada. Debido a que la toxina puede encontrarse acumulada en los tejidos en forma de conjugado con GSH o Cis, unida a proteínas o en su forma nativa; de acuerdo al método de extracción y medición elegido, se pueden detectar sólo algunas de estas fracciones o MC total acumulada (Ibelings y Chorus, 2007). En la mayor parte de la bibliografía existente, se mide MC extraíble en metanol o mezcla de alcoholes (MC nativa, conjugada con Cis o GSH) (Cazenave et al., 2005; Xie et al., 2005; Deblois et al., 2011; Sotton et al., 2012, Poste et al., 2011; entre otros), mientras que son muy pocos los trabajos en los que se cuantifica MC total, incluyendo la fracción unida a

proteínas (Williams et al., 1997a,b; Dionisio Pires et al., 2004). Dentro de la MC detectada en la fracción soluble en metanol, MC-Cis sería el conjugado predominante en la carpa fitoplanctófaga *Aristichthys nobilis*, tanto en peces colectados a campo como en individuos intoxicados con MCLR en laboratorio. Este conjugado, además, sería predominante en el riñón (He et al., 2012; Zhang et al., 2012; Li et al., 2014). En cuanto a la fracción de MCLR unida a proteínas, Williams et al., (1997a) mostraron que salmones del atlántico (*Salmo salar*) intoxicados con MCLR mediante inyección intraperitoneal, presentaban acumulación de MCLR, mayormente como MCLR unida a proteínas.

Como ya se mencionó, *O. hatcheri* es una especie planctívora-omnívora de hábitos oportunistas, cuyo tracto digestivo contiene frecuentemente cianobacterias. Sin embargo, aún no se ha determinado si esta especie consume activamente cianobacterias, como parte de la dieta, ni si es capaz de digerir su pared celular, lo que acarrearía la liberación de toxinas en el interior del tracto digestivo.

Es posible asumir, que al igual que varias especies de peces de importancia económica, *O. hatcheri* coexiste con cianobacterias potencialmente tóxicas en su ambiente natural, donde ocasionalmente ocurren floraciones. Por lo tanto, las poblaciones de esta especie están probablemente expuestas a concentraciones sub-letales de cianotoxinas, al menos estacionalmente, incluso en ausencia de floraciones visibles. La acumulación de MC en los tejidos de *O. hatcheri* bajo estas condiciones podría provocar efectos tóxicos, que resulten perjudiciales para las poblaciones de esta especie, a la vez que constituiría un riesgo para la salud humana y del ambiente.

OBJETIVOS

- Evaluar la capacidad de *O. hatcheri* para digerir células cianobacterianas y absorber MCLR, utilizando células intactas y células rotas de una cepa tóxica de *M. aeruginosa* adicionada a la dieta.
- Determinar los efectos tóxicos de MCLR en tejido intestinal y hepático de los individuos intoxicados.
- Analizar las distintas formas en las que se acumula MCLR (unida a proteínas o extraíble en metanol) en hígado e intestino, a lo largo del tiempo.

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

- **H1:** *O. hatcheri* puede acumular MCLR a partir de la ingestión de células de cianobacterias. La MCLR se acumula en tejidos como intestino e hígado, sin embargo procesos de metabolización/eliminación hacen que la toxina acumulada disminuya a lo largo del tiempo.
 - **P1a:** Luego de la alimentación con células de *M. aeruginosa*, se detectará MCLR en intestino e hígado.
 - **P1b:** En ambos tejidos se detectará MCLR en concentraciones decrecientes a lo largo del tiempo.
- **H2:** En el intestino y en el hígado de *O. hatcheri*, MCLR causa efectos tóxicos caracterizados por la inhibición de PP1 y estrés oxidativo. Estos efectos se revierten a lo largo del tiempo por eliminación de la toxina, activación de respuesta antioxidante y síntesis *de novo* de PP1.

- **P2a:** En intestino e hígado de *O. hatcheri* expuesto a cianobacterias productoras de MCLR, se detectará inhibición de PP1.

- **P2b:** El efecto planteado en P2a disminuirá a lo largo del tiempo.

- **P3a:** En intestino e hígado de *O. hatcheri* expuesto a cianobacterias productoras de MCLR, se detectarán signos de estrés oxidativo.

- **P3b:** El efecto planteado en P3a disminuirá a lo largo del tiempo.

METODOLOGÍA

Se llevó a cabo la exposición aguda de individuos de *O. hatcheri* a una dosis sub-letal de MCLR a través de una única administración de células de *M. aeruginosa* tóxicas en el alimento. Los peces tratados de esta forma recibieron 1,3 µg MCLR g⁻¹ mc. La concentración aplicada es ambientalmente relevante (Chorus y Bartram, 1999; Magalhães et al., 2001; Othaz Brida et al., 2010) y se seleccionó en base a estudios previos de nuestro laboratorio, en los cuales dicha concentración de MCLR no causó mortalidad pero sí produjo efectos bioquímicos medibles en *O. hatcheri* (Ferrada, 2010). Además, esta concentración se asemeja a las aplicadas en los trabajos de Williams et al. (1997a) y Jos et al. (2005), lo que facilita la comparación de resultados.

Aclimatación de O. hatcheri

Se utilizaron ejemplares de *O. hatcheri* (n = 120; 13,5 ± 3,5 g) mantenidos como se describe en la Metodología general (sección 2). Antes de realizar los experimentos, los peces fueron aclimatados durante una semana a las condiciones de laboratorio.

Extracción de MCLR y preparación del alimento experimental

Las células de *M. aeruginosa* (cepa tóxica) utilizadas en el alimento fueron previamente separadas del líquido de cultivo y lavadas por 3 ciclos de centrifugación y resuspensión en agua destilada, para eliminar la MCLR que estuviera libre en el medio (metodología general, sección 4b). En los tratamientos con células rotas de *M. aeruginosa*, las células fueron sometidas a 3 ciclos de congelado-descongelado y homogeneización (con homogeneizador manual de vidrio y émbolo de teflón) (Lawton y Edwards, 2001). La presencia de células rotas

se comprobó por observación al microscopio óptico (1000 x). El mismo procedimiento se llevó a cabo con células de *M. aeruginosa* del cultivo no-tóxico.

En todos los tratamientos, el alimento se preparó moliendo el pellet comercial en un mortero hasta obtener un granulado fino al cual se le agregó agua destilada (grupo control) o el volumen correspondiente de cultivo de *M. aeruginosa* (cepa tóxica o no tóxica). La pasta resultante se dejó secar parcialmente al aire y luego se pasó por un colador para volver a formar cilindros del tamaño del pellet comercial.

En todos los tratamientos se redujo la cantidad de alimento de 1 a 0,5% mc para asegurar que los peces consumieran toda la toxina. Debido al comportamiento gregario de alimentación de estos peces, el alimento se administró por grupo de pecera. Este tipo de alimentación dificulta la detección de la cantidad exacta de toxina que recibió cada individuo pero asegura que los peces acepten la comida. Se controló visualmente que cada pez consumiera alimento y que todo el alimento fuera consumido.

Experimento 1

El primer experimento consistió en 2 tratamientos (n = 3 peces/tratamiento) definidos como:

1- Células tóxicas intactas: peces que fueron alimentados con alimento comercial mezclado con células intactas de *M. aeruginosa* tóxica. Este tratamiento simularía una intoxicación de peces en una floración temprana de cianobacterias, donde la mayor parte de la MCLR estaría contenida en las células y el riesgo de absorción estaría dado por la digestión de las mismas.

2- Células tóxicas rotas: peces que recibieron alimento comercial mezclado con células de la misma cepa de *M. aeruginosa* previamente rotas por los mecanismos físicos ya descriptos. Este tratamiento simularía un caso de intoxicación en una

floración tardía de cianobacterias, donde las células de cianobacterias muertas liberarían gran cantidad de MCLR al agua.

Teniendo en cuenta que la digestión del pejerrey se completa en aproximadamente 12 horas (Hualde, com. pers.), todos los individuos fueron sacrificados transcurrido ese tiempo después de haber recibido el alimento tóxico. Se extrajeron hígado e intestino (sin contenido), se lavaron y homogeneizaron en buffer de homogeneización frío. El homogenato se centrifugó a 11000 x g durante 15 minutos y los sobrenadantes obtenidos se colectaron para ser sometidos a oxidación de Lemieux y analizados por CG/EM (metodología general, sección 8.3).

Experimento 2

Se realizaron los siguientes tratamientos: (n = 30 peces /tratamiento):

- 1- Grupo control: peces alimentados con pellet comercial.
- 2- Control de cianobacterias: peces alimentados con pellet comercial de *O. hatcheri* mezclado con células rotas de *M. aeruginosa* no tóxica.
- 3- Tratamiento tóxico: peces que recibieron alimento comercial mezclado con células rotas de *M. aeruginosa* tóxica.

Una vez administrado el alimento, 6 peces de cada tratamiento fueron sacrificados a los siguientes tiempos: 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Se extrajo el hígado y el intestino de cada individuo, se lavó, homogeneizó y se obtuvo el sobrenadante de la misma forma que en el experimento 1. El sobrenadante se utilizó para mediciones de actividad enzimática: CAT y GST (como indicadores de estrés oxidativo) y PP1 (como efecto específico de MCLR); daño oxidativo como MDA y cuantificación de proteínas. Además, se calculó el índice hepatosomático (IHS) de cada individuo como:

$$\text{IHS (\%)} = \text{Masa hígado} * 100 * (\text{Masa corporal total})^{-1}$$

En el tratamiento 3, la mitad del tejido del hígado y del intestino de 3 peces por tiempo se homogeneizó en metanol 100%. Se centrifugó a 11000 x g durante 15 minutos y del sobrenadante metanólico resultante se purificó y concentró la MCLR acumulada mediante columnas C18 (SPE; metodología general, sección 4). Para cuantificar la concentración de MCLR de estas muestras, se utilizó la técnica *in vitro* PPIA (MC extraíble en metanol). Otra fracción de los sobrenadantes metanólicos, junto con los pellets correspondientes a estas muestras, fueron sometidos a oxidación de Lemieux para cuantificación de MC total, como su producto de oxidación (MMPB), por CG/EM (metodología general, sección 8.3).

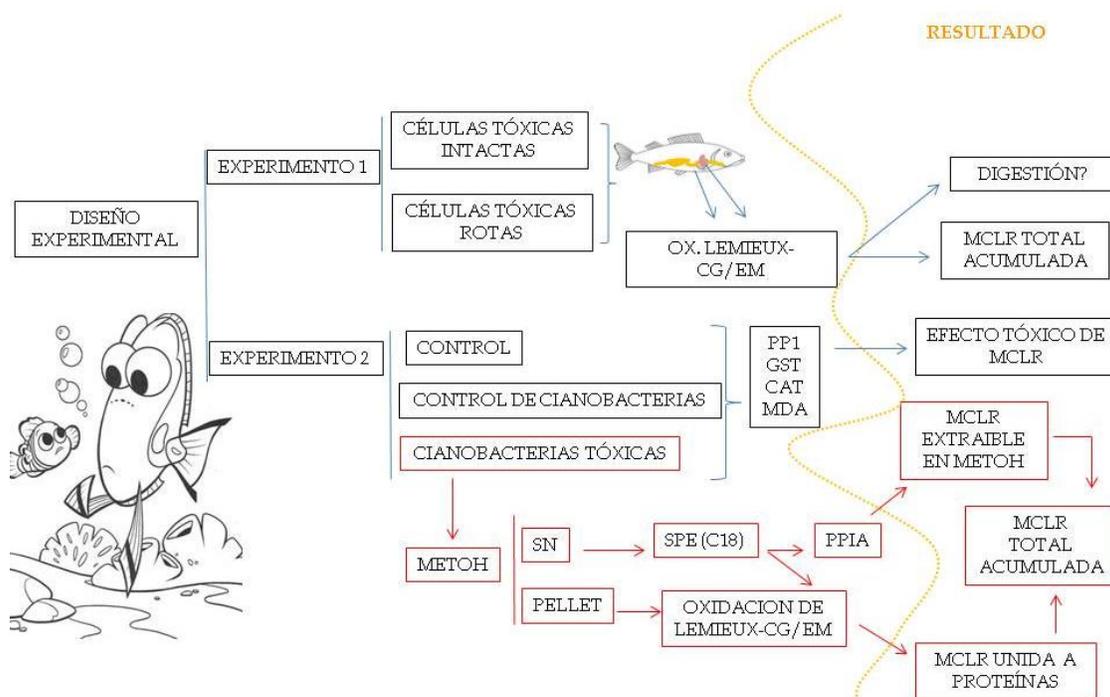


Figura 1. Resumen del diseño experimental de este capítulo. CG/EM, cromatografía gaseosa-espectrometría de masa; METOH, metanol 100%; Ox. Lemieux, oxidación de Lemieux; SN, sobrenadante; SPE, extracción en fase sólida.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías. Los efectos de los tratamientos fueron analizados por comparación

planeada LSD o por comparación *pos hoc* Newman-Keuls cuando fue necesario. Se consideraron valores de $p < 0,05$ como estadísticamente significativos (Zar, 1999).

RESULTADOS

Durante el periodo experimental ningún individuo murió. Tampoco se observaron cambios en el aspecto externo o en la conducta natatoria de los peces tratados con respecto a los controles.

Experimento 1

En las muestras de hígado de los peces alimentados con células intactas de *M. aeruginosa*, analizadas mediante oxidación de Lemieux-CG/EM, se detectó MCLR acumulada (334 ± 134 ng MCLR g^{-1} tejido). Este valor fue similar al encontrado en hígado de los peces alimentados con células rotas de *M. aeruginosa* (349 ± 139 ng g^{-1} tejido). Estos resultados sugieren que *O. hatcheri* es capaz de digerir células de cianobacterias y absorber la MCLR liberada. Los peces que recibieron células intactas de *M. aeruginosa* acumularon 174 ± 95 ng g^{-1} intestino, pero no se pudo detectar adecuadamente cuánta MCLR había en el intestino de los peces alimentados con células rotas como para hacer una comparación.

Experimento 2

No se observaron cambios significativos en el IHS de los peces expuestos a MCLR con respecto a los peces control (fig. 2). Los hígados de los peces tratados tenían aspecto saludable (coloración rosada sin signos visibles de desintegración).

Acumulación de MCLR

Los resultados de las técnicas de extracción metanólica-PPIA, aplicadas para detectar MCLR extraíble en el hígado e intestino, se resumen en la tabla 1 y figura

3, junto con los resultados de MCLR extraíble y unida a proteínas determinadas por oxidación de Lemieux-CG/EM.

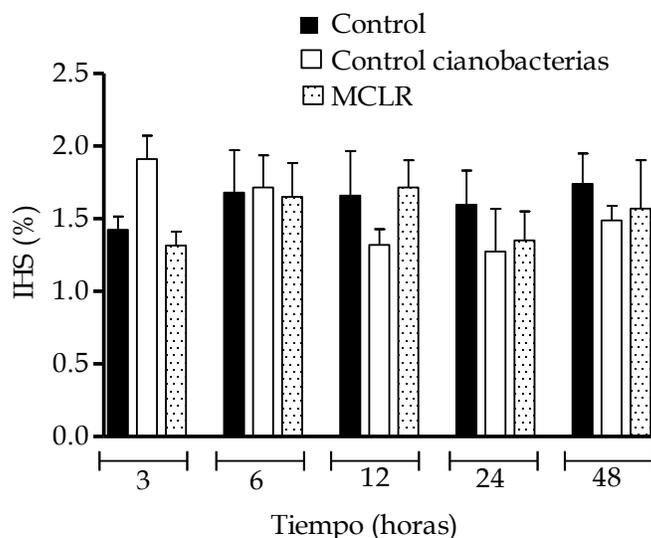


Figura 2. Índice hepatosomático de individuos de *Odontesthes hatcheri* alimentados con pellet comercial (control), pellet + *Microcystis aeruginosa* no tóxica (control cianobacterias) y pellet + *Microcystis aeruginosa* tóxica (MCLR). No se encontraron cambios significativos entre tratamientos ni en el tiempo ($p > 0,5$).

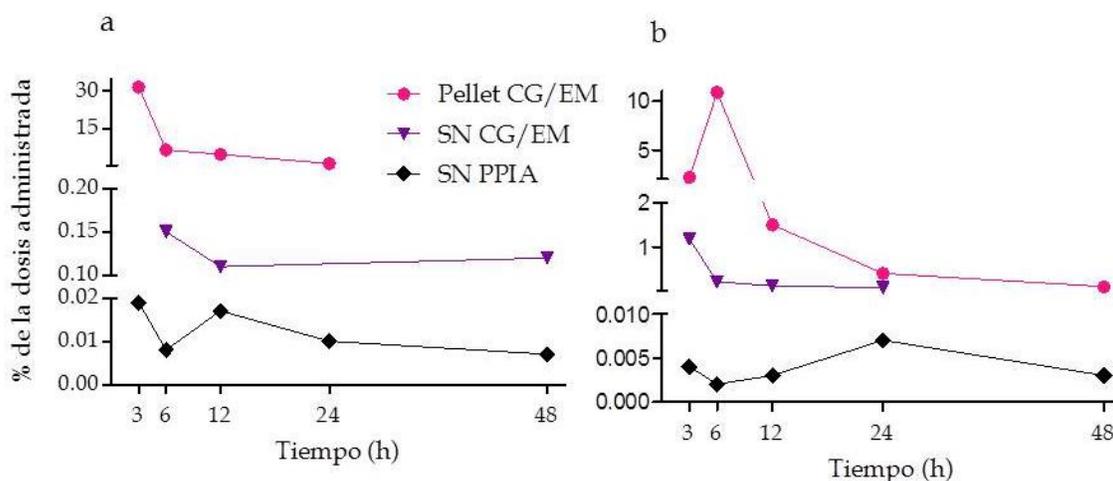


Figura 3: Porcentaje de MCLR acumulada con respecto a la cantidad de MCLR administrada en (a) intestino y (b) hígado de *Odontesthes hatcheri*. SN, sobrenadante.

Muestra	Pellet - CG/EM		Sobrenadante - CG/EM		Sobrenadante - PPIA	
	ng MCLR/ g tejido ^a	% de la MCLR administrada	ng MCLR/g tejido	% de la MCLR administrada	ng MCLR/g tejido ^b	% de la MCLR administrada
Intestino 3 h	22881	31,7	-	-	13,63 ± 6	0,019
6 h	4658	6,5	105	0,15	5,47 ± 2	0,008
12 h	3385	4,7	79	0,11	12,55 ± 5	0,017
24 h	710	1,0	-	-	7,50	0,010
48 h	-	-	84	0,12	4,90	0,007
Hígado 3 h	1943	2,2	1021	1,18	3,3	0,004
6 h	9400	10,9	186	0,21	1,3	0,002
12 h	1284	1,5	107	0,12	2,62 ± 1	0,003
24 h	384	0,4	66	0,08	5,95 ± 5	0,007
48 h	75	0,1	-	-	2,62 ± 1	0,003

Tabla 1. MCLR acumulada en intestino e hígado de *Odontesthes hatcheri*, medida por oxidación de Lemieux-CG/EM y ensayo de PP1 in vitro (PPIA). ^aValor correspondiente a la combinación de muestras de 3 individuos. ^bMedia ± error estándar n = 3. Con un guión se indican los puntos en los que la MCLR no pudo ser detectada correctamente.

El total de MCLR detectada por oxidación de Lemieux-CG/EM en intestino e hígado representó entre 1 y 31,7% y entre 0,1 y 11,1% de la MCLR administrada (1,3 µg g⁻¹ mc), respectivamente. El contenido de MCLR en la fracción extraíble mostró importantes diferencias de acuerdo al método utilizado para el análisis. Por PPIA, se obtuvieron valores muy bajos de MCLR en comparación con los detectados por CG/EM, indicando que no toda la MCLR extraíble fue capaz de inhibir la actividad de PP1. La mayor proporción de MCLR se encontró en las muestras de pellet metanólico de ambos tejidos, analizadas por oxidación de Lemieux y CG/EM, fracción correspondiente a la MCLR unida a proteínas. El intestino acumuló más MCLR que el hígado, si se considera MCLR unida a proteínas. Por otro lado, en ambos tejidos se observa que la MCLR acumulada es

mayor en los primeros tiempos de medición, decreciendo a lo largo del tiempo. Esta tendencia no es muy clara en la fracción de MCLR extraíble medible por PPIA.

Actividad de PP1 endógena

En el hígado, la actividad de esta enzima presentó una tendencia decreciente a lo largo del tiempo ($p < 0,001$) mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$). Sin embargo, cuando realizamos una comparación *a priori* LSD entre el tratamiento 3 (peces alimentados con células tóxicas) y los tratamientos 1 y 2 (grupos control) combinados, la actividad de la enzima PP1 en el tratamiento 3 fue significativamente más alta ($p < 0,001$; fig. 4). En intestino, no se observaron diferencias en la actividad PP1 entre tratamientos, sólo se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo ($p < 0,05$).

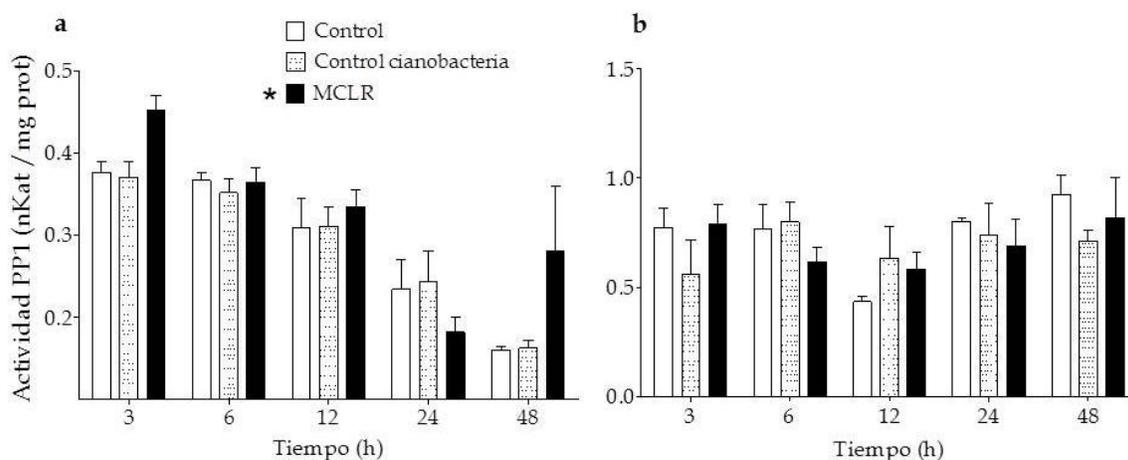


Figura 4: Actividad de la enzima PP1 en (a) hígado y (b) intestino de *Odontesthes hatcheri*. Cuando la diferencia entre tratamientos fue significativa (comparación *a priori* LSD), se colocó asterisco (*) en la leyenda del gráfico.

Glutación-S-transferasa

La actividad de GST hepática fue distinta entre tratamientos y a lo largo del tiempo ($p < 0,001$), sin interacción significativa de dichos factores. Mediante comparaciones *post hoc* se evidenciaron diferencias significativas entre todos los tratamientos. Los dos tratamientos con cianobacterias (tóxicas y no tóxicas)

causaron un incremento en la actividad de GST en comparación con la actividad de la enzima de los peces control ($p < 0,001$). La actividad de esta enzima fue mayor en el tratamiento tóxico que en el tratamiento con cianobacterias no tóxicas ($p < 0,05$). En intestino, no se observaron diferencias en la actividad GST entre tratamientos, sólo se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo ($p < 0,001$; fig. 5).

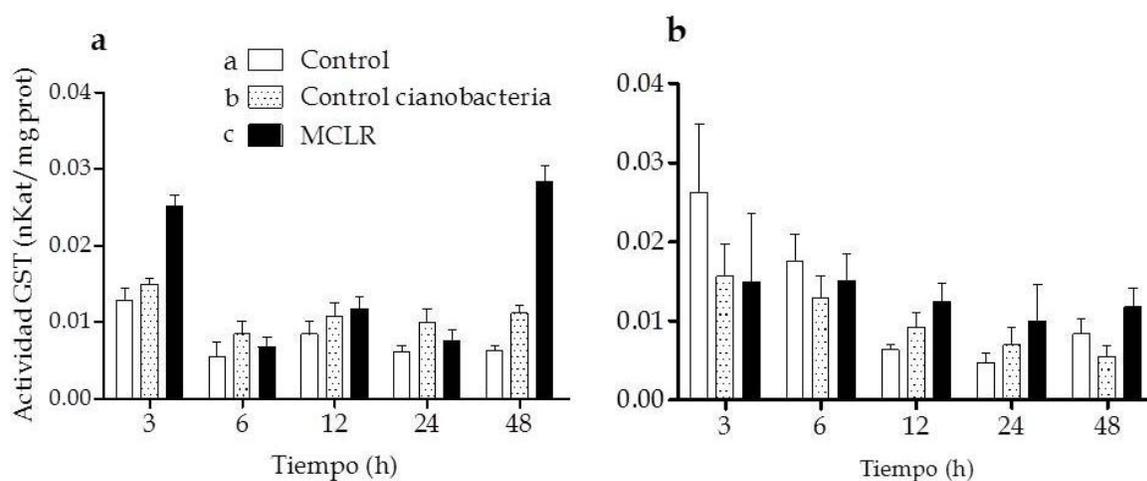


Figura 5: Actividad de la enzima GST en (a) hígado y (b) intestino de *Odontesthes hatcheri*. Cuando la diferencia entre tratamientos fue significativa (comparación *post hoc* Newman-Keuls), se colocaron letras distintas en la leyenda del gráfico.

Catalasa:

La actividad de la enzima catalasa en el hígado decreció significativamente a lo largo del tiempo; sin embargo, no se observó una tendencia clara como en PP1 ($p < 0,05$). A su vez, no se encontraron diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$) pero al comparar *a priori* por LSD el tratamiento tóxico contra los tratamientos control combinados, el tratamiento tóxico tuvo mayor actividad de catalasa ($p < 0,05$). En intestino, no se observaron diferencias en la actividad CAT entre tratamientos, sólo se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo ($p < 0,001$) (fig. 6).

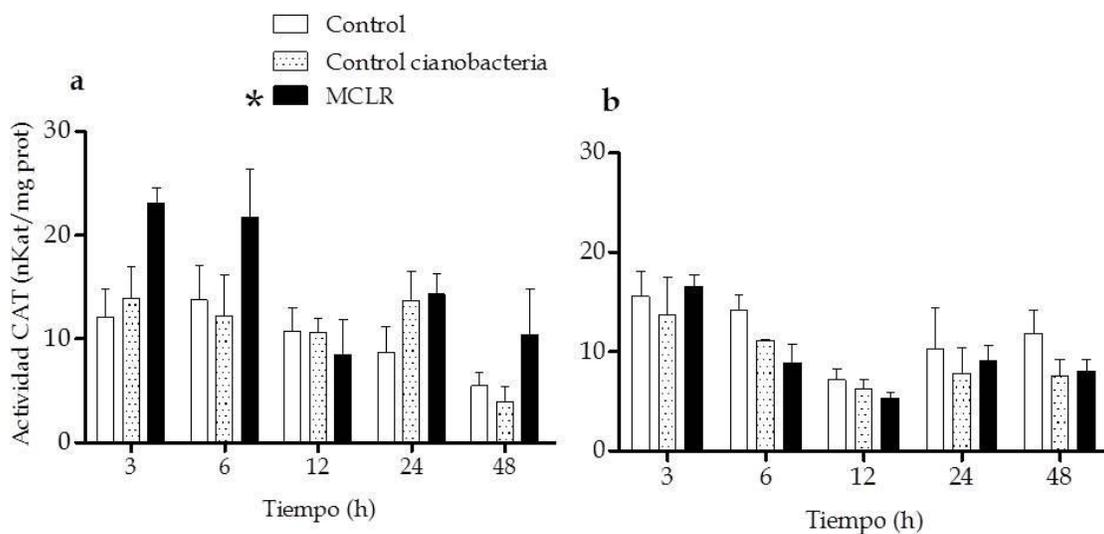


Figura 6: Actividad de CAT (a) en hígado y (b) en intestino de *Odontesthes hatcheri*. Cuando la diferencia entre tratamientos fue significativa (comparación a priori LSD), se colocó asterisco (*) en la leyenda del gráfico.

Peroxidación lipídica:

En la concentración de MDA hepática en general, se observó una tendencia decreciente a lo largo del tiempo. El ANOVA mostró diferencias significativas tanto entre tratamientos como a lo largo del tiempo ($p < 0,001$), sin interacción entre ambos factores. En el tratamiento tóxico, se observó la mayor concentración de MDA ($p < 0,001$). Entre los tratamientos 1 y 2 no se observaron diferencias significativas. Se evidencia una tendencia de compensación a lo largo del tiempo en el tratamiento tóxico, alcanzando valores control a las 24 horas. En intestino, no se observaron diferencias en la concentración de MDA entre tratamientos, sólo se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo ($p < 0,001$; fig. 7).

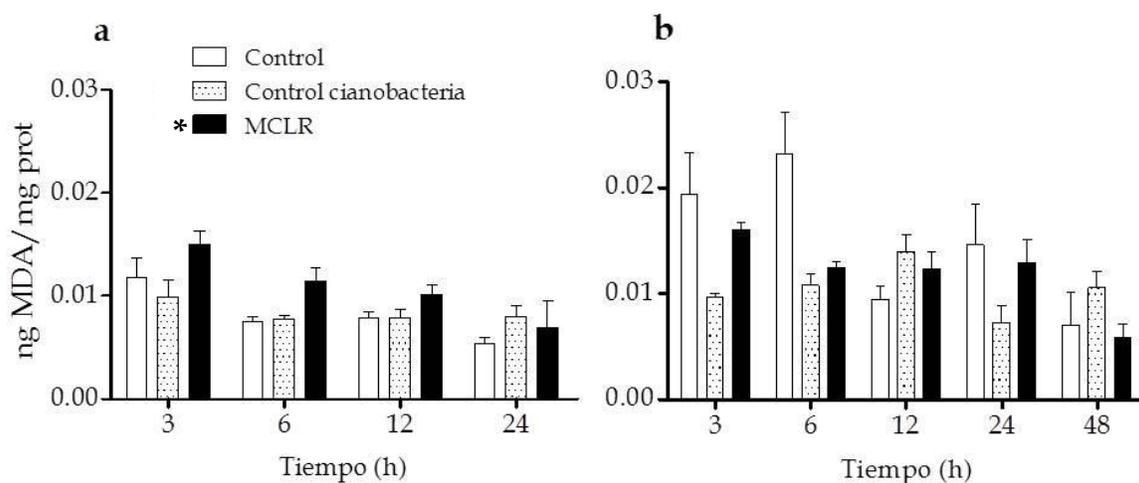


Figura 7: Concentración de MDA (a) en hígado e (b) en intestino de *Odontesthes hatcheri*. Cuando la diferencia entre tratamientos fue significativa (comparación pos hoc Newman-Keuls), se colocó asterisco (*) en la leyenda del gráfico.

DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó la capacidad de *O. hatcheri* para digerir cianobacterias, se analizó la absorción de MCLR, la cinética de acumulación y los efectos tóxicos de dicha toxina en intestino e hígado, tras una única administración por vía oral de células de *M. aeruginosa* tóxicas. Los resultados obtenidos en el experimento 1 de este capítulo, en el cual peces alimentados con células sanas y rotas de *M. aeruginosa* acumularon cantidades similares de MCLR en sus tejidos, indican que, una vez que las cianobacterias llegan al interior del tracto digestivo de *O. hatcheri*, son digeridas y la MCLR liberada es absorbida (P1a). Este panorama refleja, además, que el riesgo de intoxicación por MCLR para esta especie existe tanto en una floración temprana como en una senescente. Además, esta capacidad de digerir cianobacterias sugiere que esta especie podría incorporar cianotoxinas de manera relativamente continua durante las épocas en que éstas son abundantes en el fitoplancton aunque no lleguen a formar floraciones. Por otro lado, indica que *O. hatcheri* digiere completamente las células de cianobacterias. En contraste, Jos et

al. (2005) observan más efectos tóxicos en individuos de *Oreochromis sp.* alimentados con células rotas de *M. aeruginosa* con respecto a los alimentados con células sanas, lo que sugiere una digestión incompleta de las cianobacterias.

Para dilucidar la cinética de la acumulación de MCLR en hígado e intestino, se utilizaron dos técnicas de medición, oxidación de Lemieux- CG/EM y PPIA. Tres horas después de la ingestión de células tóxicas, la MCLR acumulada representó cerca del 32%, en intestino y 2% en hígado con respecto al total de MCLR administrada. A las 6 horas este porcentaje cambió a 7% y 11% en intestino e hígado, respectivamente. Este cambio temporal sugiere la transferencia de parte de la toxina desde el intestino hacia el hígado. La diferencia entre la toxina detectada en intestino e hígado probablemente se deba a excreción desde las células del intestino hacia el lumen del órgano aunque parte de la toxina puede haberse derivado al riñón. Esto significaría que el intestino de *O. hatcheri* constituye una barrera frente a la captación de MCLR. En los tiempos más largos de medición (24 - 48 horas), el contenido de MCLR fue muy bajo o indetectable en ambos tejidos (P1b). Sin embargo no es posible descartar que parte de la MCLR absorbida haya sido transferida a otros tejidos. Al igual que en este trabajo, otros estudios con peces sugieren que procesos de metabolización y/o eliminación afectan la acumulación de MCLR en los tejidos a lo largo del tiempo (Williams et al., 1997a; Bury et al., 1998; Xie et al., 2004). En el primero de estos trabajos, se midieron MCLR total y extraíble en hígado de salmones intoxicados con 2 μg MCLR g^{-1} mc por vía intraperitoneal, utilizando como técnicas de medición la oxidación de Lemieux-CG/EM y PPIA. A las 7 horas posteriores a la intoxicación, el total de la MCLR en el hígado de los salmones alcanzó el 33% de la dosis inyectada. Este valor resulta similar al 32% detectado en este trabajo de tesis a las 3 horas post-intoxicación en el intestino de *O. hatcheri*. Por el contrario, sólo el 2% y 11% de la dosis administrada se detectó en el hígado de *O. hatcheri* a las 3 y 6 horas respectivamente. Estas diferencias en el patrón de acumulación entre ambos

trabajos podrían relacionarse con las diferencias en la ruta de intoxicación y coinciden con la mayor sensibilidad de los peces a la intoxicación intraperitoneal que a la intoxicación por vía oral (Fischer y Dietrich, 2000).

Los resultados del experimento 2 permiten observar que la MCLR unida a proteínas fue la fracción dominante tanto en hígado como en intestino, representando del 98 a cerca del 100% y del 66 a cerca del 100% del total acumulado en intestino e hígado, respectivamente. Estos valores coinciden con trabajos que estiman que la mayor proporción de MC acumulada se encuentra unida a proteínas (Williams et al., 1997a,b; Dionisio-Pires et al., 2004; Ibelings y Chorus, 2007) y se asemejan a los obtenidos por Williams et al. (1997a), quienes encontraron que del 38 al 99% de la MCLR total acumulada estaba unida a proteínas. Además, se observa que el pico de acumulación de MCLR en el hígado es posterior al detectado en intestino. Es interesante notar que, en intestino la mayor parte de la MCLR a las 3 horas se detecta en la fracción unida a proteínas, con solo el 0,02% en la fracción soluble; sin embargo, una parte importante de la toxina acumulada en intestino aparece luego en el hígado. Aparentemente, las proteínas unidas a MCLR se degradan en los enterocitos y los residuos solubles de MCLR unida a uno (cisteína) o a unos pocos aminoácidos, son transportados hacia la luz del intestino (excretados) o hacia la sangre y posteriormente al hígado o al riñón. Williams et al., (1997a) describen una tasa de eliminación de MCLR acumulada en el hígado de los salmones similar a la que se describe en este experimento con *O. hatcheri*. Esto sugiere que el hígado de los peces puede degradar las proteínas unidas a la toxina a compuestos más pequeños, susceptibles de ser transportados y excretados en un plazo de horas. Otro antecedente de metabolización y eliminación de MCLR acumulada se observa en el trabajo de Sotton et al. (2012), donde se estudió la cinética de acumulación de MCLR en *Perca fluviatilis*, luego de alimentación forzada con 0,05 ó 0,5 $\mu\text{g MCLR g}^{-1}$ mc. Dichos autores observaron un patrón de acumulación similar al que se obtuvo en este trabajo de tesis, con el máximo de MCLR acumulado en hígado detectado a las 6

horas post-intoxicación, aunque los valores de acumulación de MCLR en *P. fluviatilis* son más bajos que los detectados en *O. hatcheri*, probablemente porque como método de detección utilizaron solamente ELISA, que no detecta MCLR unida a proteínas y la dosis administrada fue menor que la de este estudio.

En cuanto a la MCLR extraíble, se observan diferencias importantes (1-2 órdenes de magnitud) entre los resultados obtenidos según el método empleado para el análisis. Por oxidación de Lemieux-CG/EM se detectó mayor concentración de MCLR en comparación con lo detectado por PPIA. Esto sugiere que parte de la MCLR presente en la extracción metanólica no es inhibitoria de PP1. En esta fracción se espera encontrar MCLR en su forma nativa y conjugada con GSH y Cis (Williams et al., 1997a; Pflugmacher et al., 1998; Yuan et al., 2006). Sin bien, estos conjugados han sido descriptos como menos tóxicos que MCLR nativa (Kondo et al., 1992), Ito et al. (2002) observaron que su capacidad para inhibir PP1 y 2A no es muy inferior. Por lo tanto, la presencia de estos conjugados en hígado e intestino de *O. hatcheri* no explicaría las diferencias observadas entre los resultados obtenidos por las dos formas de detección de MCLR utilizadas. Se podría especular que una buena parte de la fracción metanólica, corresponde a MCLR unida a fragmentos peptídicos derivados de la degradación de las proteínas a las que originalmente estaba unida. Esta hipótesis permitiría explicar la progresiva disminución de la MCLR acumulada en ambos tejidos a lo largo del tiempo. Trabajos previos, (Amorin y Vasconcelos 1999; Soares et al. 2004), muestran procesos de metabolización de proteínas unidas a MCLR en almejas y peces, respectivamente. En ambos estudios, se detectan altas concentraciones de MCLR durante los periodos de depuración posteriores a la intoxicación y se propone que el reciclaje de proteínas unidas a MCLR podría dar lugar a la liberación de la toxina, haciendo que sea detectable por ELISA. En el mismo sentido, en una serie de estudios a campo y de laboratorio, (He et al., 2012; Zhang et al., 2012; Li et al., 2014), MCLR y RR se detectaron en su mayor parte como conjugados de cisteína, especialmente en riñón. Aunque en estos trabajos no se midió MC unida a

proteínas, se propuso que la presencia del conjugado MC-Cis estaría relacionada con la degradación de PP unidas a MC. Por el contrario, en esta tesis, la baja capacidad de inhibición de PP1 de la fracción de MCLR extraída en metanol de hígado e intestino de *O. hatcheri*, sugiere que otros productos de degradación proteica son más abundantes que los conjugados con Cis y GSH.

En esta tesis, a pesar de la importante acumulación de MCLR observada en intestino, no se detectaron efectos tóxicos como inhibición de PP endógena ni como estrés oxidativo, contrariamente a lo planteado en las predicciones 2 y 3. Son pocos los trabajos en los que se estudió la toxicidad de MCLR en intestino de peces y la mayoría de ellos describe alteraciones histopatológicas (Fischer y Dietrich, 2000; Ernst et al., 2006; Malbrouck y Ketesmont; 2006). Cazenave et al. (2006) estudiaron alteraciones en la defensa antioxidante de varios tejidos de individuos de *Corydoras paleatus* expuestos a distintas concentraciones de MCRR disuelta en el agua. Los autores describen que los órganos principalmente afectados fueron el hígado y las branquias, mientras que en intestino no observaron respuestas significativas frente a MCRR, a excepción de la inhibición de GST.

En esta tesis, en el hígado de *O. hatcheri*, se encontraron alteraciones enzimáticas y estrés oxidativo significativos frente a la exposición con MCLR (acorde a la predicción 3a), aunque estas respuestas mostraron un daño hepático moderado. En cuanto al aspecto general del órgano no se detectaron diferencias entre controles y tratados ni cambios en el IHS, coincidiendo con otros trabajos en peces donde no se evidencian cambios en el IHS (Tencalla y Dietrich, 1997; Atencio et al., 2008). En estos casos, el IHS no parece ser un buen índice de toxicidad por MCLR. En cuanto a los efectos tóxicos producidos por MCLR, en este trabajo se observa incremento de la actividad de la enzima PP1 en el hígado de los peces intoxicados, en contraste con la inhibición esperada (P2a). Este resultado podría deberse a modulación postraducciona (Oliver y Shenolikar, 1998; Therien y Blostein, 2000; Bollen, 2001; Wang et al., 2010a,b) y/o a síntesis *de novo* de la enzima. A pesar de que existen abundantes trabajos *in vitro*, en los que se observa

inhibición de PP1 endógena por MCLR (Honkanen et al., 1990; MacKintosh et al., 1990, 1995; Ito et al., 2002), los efectos *in vivo* de la toxina en la actividad de PP1 en peces se han medido en pocos estudios (Tencalla y Dietrich, 1997; Runnegar et al., 1999; Malbrouck et al., 2004; Wang et al., 2010a,b). De estos trabajos, los dos últimos muestran activación de PP en hígado y cerebro del pez cebra (*Danio rerio*) expuesto crónicamente a MCLR. Mientras que Runnegar et al. (1999) describen un efecto dependiente de la dosis en el hígado de la raya (*Raja erinacea*) inyectada intraperitonealmente con MCLR, con incremento de actividad de PP a $0,005 \mu\text{g g}^{-1}$ mc y una inhibición del 85% a $0,063 \mu\text{g MCLR g}^{-1}$. Tencalla y Dietrich (1997), intoxicaron individuos de *O. mykiss* mediante administración forzada con $5,7 \mu\text{g MCLR g}^{-1}$ mc y, entre 1 y 72 horas post-intoxicación, observaron daños severos en el hígado, con inhibición de la actividad de las enzimas PP y acumulación de MCLR en plasma e hígado. La actividad de PP se inhibió prácticamente en su totalidad a las 3 horas post-intoxicación y se recuperó hasta un 50% a las 72 horas. Esto podría indicar un recambio de las proteínas unidas a MC. De acuerdo a Wang et al. (2010a) y según nuestros resultados, se podría plantear que, dependiendo de la especie y la concentración de MCLR administrada, la estimulación postraducciona y/o la inducción génica podrían compensar o incluso superar el efecto inhibitorio inicial causado por MCLR. Sin embargo, estas posibles respuestas tendrían que ser evaluadas a través de estudios de respuesta en función de la concentración y del tiempo, en los que se evalúen la actividad, la expresión génica de PP y la activación de vías de señalización celular. Por otro lado, en todos los tratamientos aplicados en el experimento 2 de este capítulo, se observa una caída de la actividad de PP1 en el hígado a lo largo del tiempo. Este resultado es probablemente consecuencia del ayuno de los individuos, al igual que lo observado por Malbrouck et al. (2004) en hepatocitos aislados de *Carassius auratus*.

Distintas formas de la enzima GST participan en la detoxificación de compuestos tóxicos como MCLR (Pflugmacher et al., 1998; Hao et al., 2008). La conjugación con GSH se describe como el paso inicial en la detoxificación de la

toxina y es un evento importante para prevenir la bioacumulación de MCLR y su toxicidad. En los resultados de este capítulo, se observa que la actividad de GST hepática fue mayor en los tratamientos con cianobacterias, tanto tóxicas como no tóxicas con respecto a la actividad control. Este incremento de actividad fue mayor en el tratamiento tóxico que en el no tóxico. En la bibliografía se describen diferentes respuestas de GST en peces frente a la intoxicación con MC, como inhibición (Cazenave et al., 2006), inducción (Li et al., 2005; Qiu et al., 2007) o ausencia de efecto (Li et al., 2003; Malbrouck et al., 2003; Sotton et al., 2012). En *O. hatcheri*, el aumento de actividad de GST observado podría reflejar una respuesta moduladora, que incrementa la tasa de conjugación de MCLR con GSH, lo que favorecería su excreción por el sistema biliar (Sahin et al., 1996). Por otro lado, el incremento menor aunque significativo, observado en los individuos alimentados con cianobacterias no tóxicas, podría estar inducido por componentes tóxicos de la pared celular, como los liposacáridos (LPS). Sin embargo, debido a que *O. hatcheri* resultó capaz de digerir las células de cianobacterias y, por lo tanto, de liberar contenidos intracelulares, no es posible discriminar entre los efectos producidos por componentes intracelulares o por LPS, en este experimento.

La enzima CAT participa en la detoxificación de peróxido de hidrógeno y es una enzima importante en la defensa frente al estrés y daño oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2007). En los experimentos de este capítulo, la actividad de CAT hepática fue mayor en el tratamiento tóxico, coincidiendo con un incremento del daño oxidativo a lípidos (MDA). Resulta interesante observar que los picos máximos de actividad de CAT y de nivel de MDA se detectaron a las 3 y 6 horas, coincidiendo con los valores máximos de MCLR acumulada en este tejido. Esto sugiere un probable efecto pro-oxidante de MCLR en el hígado, el cual es parcialmente compensado por inducción de CAT. Incrementos en la actividad de esta enzima producto de MCLR, también se han descrito para otras especies como tilapia, *Oreochromis sp.* (Jos et al., 2005), *Corydoras paleatus* (Cazenave et al., 2006) y para hepatocitos aislados de *Cyprinus carpio* (Li et al., 2003). En los dos

primeros trabajos, el nivel de MDA también está incrementado. Por otro lado, Atencio et al. (2008) observaron incremento de MDA, junto con un descenso en la actividad de CAT en el hígado de *Tinca tinca*. Los efectos observados en la actividad de GST, CAT y el daño a lípidos, el cual se revierte a lo largo del tiempo, coinciden con lo esperado (P3a y b).

CAPÍTULO II

Transporte de microcistina-LR a través del
intestino en *Odontesthes hatcheri* y
Oncorhynchus mykiss

INTRODUCCIÓN

El sistema gastrointestinal tiene múltiples funciones, entre las que se destacan la digestión y absorción de nutrientes. Al mismo tiempo, es uno de los sistemas más expuestos a sustancias tóxicas y funciona como una barrera de defensa frente a las mismas. Esta barrera está constituida por una gran variedad de enzimas citosólicas y transportadores de membrana, que llevan a cabo procesos de biotransformación y eliminación de compuestos tóxicos. Debido a que la acumulación y toxicidad de MCLR en los animales acuáticos de consumo humano implica un importante riesgo para el ambiente y la salud humana, en este capítulo se evalúan las posibles vías de absorción y eliminación de MCLR en intestino de *O. mykiss* y *O. hatcheri*.

Transporte a través del epitelio intestinal

La concentración de un compuesto químico en el organismo está determinada fundamentalmente por procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción; por lo tanto, su efecto fisiológico estará a su vez, determinado por estos procesos (Klaassen y Aleksunes, 2010). El flujo de un compuesto químico a través de la membrana celular es un paso principal para su absorción y eliminación. En algunos casos, la difusión simple es suficiente para que un compuesto químico entre a la célula, así como para que sea eliminado de forma pasiva. En otras instancias, las propiedades físicas y químicas tales como tamaño, carga e hidrofiliicidad son determinantes para atravesar la membrana celular por difusión, por lo que el flujo es mediado por proteínas específicas, que facilitan el paso de compuestos químicos de un lado al otro de la membrana celular.

Actualmente, se conoce que la membrana apical de los enterocitos posee una gran variedad de proteínas de transporte, que facilitan la captación de aminoácidos, péptidos, hexosas, aniones orgánicos, cationes orgánicos, nucleótidos y otros nutrientes (Takano et al., 2006; Klaassen y Aleksunes, 2010). A su vez,

muchas drogas o sustancias tóxicas ingresan al organismo a través de estos transportadores, dependiendo de su similitud molecular con los sustratos fisiológicos de cada transportador.

La biodisponibilidad de drogas terapéuticas y el flujo de compuestos endógenos, como ácidos biliares y colesterol, están asociados frecuentemente a dos superfamilias de transportadores: los transportadores de solutos (SLC, *solute carrier*) y los transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporters*). Los SLC forman parte de los principales transportadores encargados de facilitar la absorción de compuestos químicos y también son las vías de entrada de numerosos compuestos tóxicos como MCLR, mientras que los transportadores ABC funcionan como bombas de exportación, que, a expensas del consumo de ATP, remueven compuestos tóxicos y productos metabólicos de la célula u organelas (Klaassen y Aleksunes, 2010).

El sistema gastrointestinal de los peces, además de ser fundamental en la digestión y absorción de nutrientes, tiene un papel primordial en la osmorregulación, el equilibrio acido-base y en la inmunidad del organismo (Marshall y Grosell, 2006; Cain y Swan, 2011). A su vez, al igual que en mamíferos, es uno de los principales órganos implicados en la eliminación de compuestos tóxicos, ya sean endógenos o exógenos.

Absorción de MCLR

Debido al peso molecular y la polaridad de algunas variantes de MC, entre las cuales se destaca MCLR, estas moléculas no podrían atravesar la membrana celular por difusión. MCLR ingresaría a la célula mediante transportadores del sistema biliar, específicamente a través de los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP). Este transporte de MCLR se ha estudiado, tanto *in vivo* como *in vitro*, en mamíferos así como también en peces (Runnegar et al., 1999; Fischer et al., 2005, 2010; Boaru et al., 2006; Meier-Abt et al., 2007; Lu et al., 2008).

Los OATP son miembros de la superfamilia SLC y pertenecen al grupo de transportadores de aniones orgánicos Na⁺-independientes (Fischer et al., 2005; Klaassen y Aleksunes, 2010). Poseen un amplio espectro de sustratos, que comprende sales biliares, ácidos biliares, colorantes aniónicos de diagnóstico, esteroides neutros y varios péptidos lineares y cíclicos (dentro de estos últimos se encontraría MCLR) (Hagenbuch y Meier, 2003). Los OATP se expresan en diversos órganos como intestino, hígado, riñón, corazón, pulmón, bazo, páncreas, cerebro y en la barrera hematoencefálica (Feurstein et al., 2010).

Boaru et al. (2006) observaron que hepatocitos primarios de *O. mykiss* y de mamíferos sufrían efectos tóxicos frente a MCLR, mientras que líneas celulares de hígado e intestino del mismo origen, no lo hacían. Posteriormente encontraron que estas diferencias de toxicidad se debían a la pérdida de expresión de Oatp en las líneas celulares, por lo que MCLR no ingresaba a las células. Los hepatocitos primarios de *O. mykiss* y de mamíferos, mantenían la expresión de Oatp en sus membranas y eran capaces de absorber MCLR. Fischer et al. (2005), estudiaron el transporte de MCLR por diferentes Oatp de rata y OATP de humanos, utilizando *Xenopus laevis* como modelo de expresión. De sus resultados concluyen que Oatp1b2 de rata y OATP1B1 y OATP1B3 de humano, serían los responsables del transporte de MCLR en el hígado, mientras que OATP1A2 mediaría el transporte de MCLR a través de la barrera hematoencefálica. Incluso, según estos autores, el hecho de que el hígado y el cerebro estén entre los órganos más afectados por MCLR podría explicarse por la presencia de estos transportadores OATP en dichos tejidos.

En cuanto al flujo hacia la sangre (absorción) de MCLR, se desconoce la vía de transporte a través de la membrana basolateral del enterocito. Hasta el momento no hay estudios que mencionen qué tipo de proteínas estarían implicadas en este transporte.

Mecanismos de detoxificación

En el intestino, la captación y los efectos tóxicos intracelulares de compuestos naturales y antropogénicos están limitados por un sistema de defensa que se basa en la actividad de enzimas de biotransformación y transportadores de membrana de la superfamilia ABC (Ishikawa, 1992; Chan, et al., 2004; Klaassen y Aleksunes, 2010).

Los transportadores ABC acoplan la hidrólisis del ATP al transporte de sustratos a través de la membrana celular y presentan dominios de unión a ATP característicos, que dan lugar a su denominación (*ATP-Binding Cassette*). Entre estos transportadores, se destacan tres componentes responsables de la defensa frente a compuestos tóxicos: la glicoproteína-P (MDR1, ABCB1, Pgp), la proteína asociada a resistencia a múltiples drogas tipo 2 (MRP2, ABCC2) y la proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP, ABCG2). Estas proteínas son fundamentales para cualquier sistema vivo, debido a que eliminan un amplio espectro de sustancias, además de transportar sustratos fisiológicos, principalmente compuestos biliares. Dentro de los sustratos que transportan, se encuentran numerosas drogas terapéuticas, por lo que son mediadores de la denominada “resistencia a múltiples drogas” (MDR), descrita originalmente en células tumorales de mamíferos (Gottesman y Pastan, 1993).

En general, el proceso de biotransformación y eliminación de un compuesto tóxico se describe en 4 fases, que no siempre son consecutivas. Este sistema de defensa es prácticamente universal, ya que se ha descrito desde arqueobacterias hasta humanos (Bard, 2000; Ferreira et al., 2014a). Una vez que un compuesto tóxico ingresa a la célula, ya sea por difusión o dependiendo de transportadores de membrana, puede ser eliminado directamente (fase 0) o sufrir transformaciones en las fases I y/o II (fig. 1). La fase I comprende reacciones de oxidación, epoxidación, hidroxilación, metilación, ruptura de enlaces éster, entre otras reacciones que convierten al compuesto en sustrato de las enzimas de fase II o de un transportador ABC. Las principales enzimas que participan en fase I son las

monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (CYP). En el intestino de mamíferos se expresan varias CYP, incluyendo CYP3A4 en la chapa estriada del epitelio intestinal, el principal sitio de absorción (Takano et al., 2006). Las reacciones de fase I generalmente dan productos menos tóxicos que el compuesto nativo aunque en algunos casos originan compuestos de mayor toxicidad. La fase II consiste en la conjugación de compuestos provenientes de fase I o que no sufrieron transformación previa con ácido glucurónico, GSH o sulfatos. Estas conjugaciones son catalizadas por enzimas transferasas (UGT, GST y SULT, respectivamente) y están asociadas al retículo endoplasmático o al sitio donde ocurre la reacción de fase I, disminuyendo así la vida media de los productos de esta fase (Zamek-Gliszczynski et al., 2006). Los productos de fase II son principalmente sustratos de los transportadores ABCC y ABCG2 (Chan et al., 2004; Klaassen y Aleksunes, 2010). En mamíferos, se han descrito varias isoformas de GST, de expresión variable según el órgano considerado. Por otro lado, se ha observado una asociación espacial y funcional en intestino, entre las enzimas de biotransformación de fase I y fase II y los transportadores ABCB1 y ABCC2, lo que sugiere una actuación coordinada en la eliminación de compuestos tóxicos (Mottino et al., 2000; Catania et al., 2004; Chan et al. 2004). La fase III, por último, comprende la exportación de los compuestos tóxicos transformados en fases I/II hacia afuera de la célula, a través de los transportadores ABC ya mencionados y descritos en mayor detalle a continuación:

ABCB1: Esta glicoproteína de 170 kDa fue descrita en la década de 1970, en células tumorales que presentaban resistencia a múltiples drogas (Takano et al., 2006). Recibió el nombre de glicoproteína-P (Pgp) debido a que modula la permeabilidad de la membrana frente a numerosas drogas aparentemente no relacionadas. Posteriormente, se encontró en tejidos normales humanos: riñón, hígado, intestino, pulmón, cerebro, piel, estómago, ovario, músculo, corazón, próstata, entre otros; así como también en importantes barreras sanguíneas, incluyendo la barrera hematoencefálica (Chan et al., 2004; Takano et al., 2006). En

el intestino de humanos, se ha visto que ABCB1 se expresa mayormente en la superficie apical del epitelio (chapa estriada), sobre todo en las regiones distales del intestino (íleon y colon), decreciendo la expresión hacia el intestino proximal (yeyuno, duodeno) (Chan et al., 2004; Takano et al., 2006). ABCB1 reconoce una gran variedad de compuestos estructural y farmacológicamente no relacionados entre sí, generalmente de carácter hidrofóbico, neutros o con carga positiva (Chan et al., 2004). Entre los sustratos descritos para ABCB1, se encuentran drogas anticancerígenas, inmunosupresores, hormonas esteroideas, antivirales, inhibidores de canales de calcio, etc. Como se mencionó anteriormente, muchos compuestos no metabolizados (fase 0) y metabolitos derivados de fase I son sustratos de ABCB1.

ABCC: Esta familia comprende 9 miembros (ABCC1-9). En comparación con ABCC1 y 2, los más estudiados, es menos lo que se conoce sobre otros ABCC aunque se sugiere que ABCC3, 4 y 5 también contribuirían a la defensa frente a xenobióticos (Borst et al., 2007). ABCC2 tiene localización apical en gran cantidad de tejidos, incluyendo el epitelio intestinal, mientras que otros ABCC se ubican en membrana basolateral o su localización aún es desconocida o poco clara (revisiones de Borst et al., 1999; Chan et al., 2004; Klaassen y Aleksunes, 2010). ABCC2 fue caracterizado funcionalmente como transportador de aniones orgánicos en la membrana canalicular de hepatocitos. Es una proteína de 190 kDa, que, al igual que ABCB1, se encontró tanto en células tumorales resistentes a drogas terapéuticas como en numerosos tejidos normales. A diferencia de ABCB1, ABCC2 transporta compuestos relativamente hidrofílicos, incluyendo sustratos endógenos y exógenos conjugados con glucurónidos, glutatión y sulfato, por lo tanto exporta productos de fase II y también algunos compuestos no conjugados (Chan et al., 2004; Takano et al., 2006). Entre los sustratos de este transportador, se encuentran el 2,4-dinitrofenil-S-glutathion (DNP-SG), glucurónidos de bilirrubina y leucotrieno C4, calceína, entre otros. También pueden transportar moléculas de glutatión reducido y oxidado (GSH y GSSG) y numerosas drogas terapéuticas o conjugados

de las mismas (Fardel et al., 2005). En cambio, ABCC1 y 3 comparten afinidad por varios sustratos de ABCC2 pero al ser de ubicación basolateral en los enterocitos, se encargan del transporte hacia la sangre de compuestos endógenos y exógenos. ABCC1 compartiría afinidad por algunos sustratos con ABCB1 (Luckenbach et al., 2014) y con ABCC2 comparte, por ejemplo, la capacidad de transportar moléculas de GSH. Por otro lado también se ha visto que ABCC1, ABCC2 y proteínas homólogas de invertebrados transportan metales como el cadmio, mercurio, arsénico y platino, probablemente conjugados con GSH (Miller et al., 2007; revisión de Luckenbach et al., 2014). En cuanto a su distribución y al igual que lo observado con ABCB1, el transportador ABCC2 no se encuentra de manera uniforme a lo largo del intestino en mamíferos. Por el contrario, mediante estudios de histoquímica y Western blot en intestino delgado de rata, se observa que ABCC2 es expresado en la membrana apical mayormente en la región proximal del intestino, decreciendo del yeyuno al íleon (Mottino et al., 2000; Takano et al., 2006). A su vez, se expresa en mayor densidad en el extremo distal de las vellosidades y decrece hacia las criptas intestinales (Mottino et al., 2000). En cuanto a ABCC4, es poco lo que se conoce aún respecto a los sustratos que transporta. En particular, se lo ha relacionado con el flujo de ácido fólico, metotrexato, AMPc, GMPc, ácidos biliares, prostaglandina E, entre otros compuestos (Klaassen y Aleksunes, 2010) y su ubicación en la membrana celular es aún poco clara y poco estudiada.

ABCG2: Actualmente se sabe que este transportador, aislado y descrito a partir de células tumorales de mama, se expresa tanto en células tumorales como en células normales. ABCG2 se encuentra en la membrana apical de los enterocitos y tiene afinidad por sustratos similares a los de ABCB1 y ABCC1, debido a que ABCG2 reconoce drogas contra el cáncer relativamente hidrofóbicas y también sería capaz de eliminar conjugados con ácido glucurónico y sulfato (Chan et al., 2004; Takano et al., 2006; Klaassen y Aleksunes, 2010).

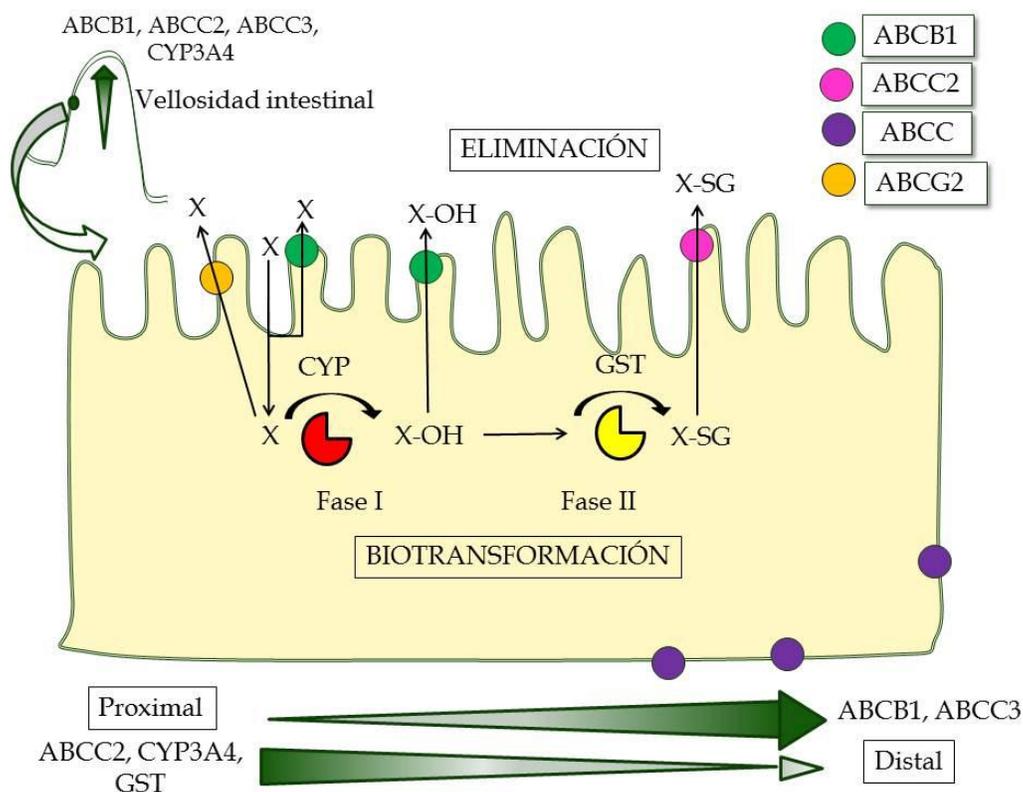


Figura 1. Modelo general de vías de detoxificación de xenobióticos y localización descrita para mamíferos, de las principales enzimas de biotransformación y transportadores ABC (basado en esquema de Chan et al., 2004 y Bieczynski et al., 2014). ABCB1, glicoproteína-P; ABCC2, proteína de resistencia a múltiples drogas tipo 2; ABCC, proteínas de resistencia a múltiples drogas de ubicación basolateral (por ejemplo: ABCC1, 3); ABCG2, proteína de resistencia de cáncer de mama; CYP, enzimas citocromo P450 (como ejemplo de fase I de biotransformación); GST, glutatión S-transferasa (como ejemplo de fase II); X, xenobiótico; X-OH xenobiótico hidroxilado; X-SG, xenobiótico conjugado con glutatión. Las flechas indican mayor abundancia (zona de mayor grosor) o menor (zona de menor grosor) de transportadores y enzimas a lo largo del intestino. En la esquina superior izquierda se representa una vellosidad intestinal donde se observa mayor abundancia de transportadores ABC y enzimas de biotransformación en el extremo apical.

Mecanismos de detoxificación en animales acuáticos

Las proteínas de la superfamilia ABC tienen un alto grado de conservación entre distintos grupos; se han descrito proteínas homólogas a las de mamíferos en numerosos organismos acuáticos como moluscos, crustáceos, anfibios, esponjas y varias especies de peces (Kurelec, 1992; Bard et al., 2000; Smital et al., 2004; Epel et al., 2008; Ferreira et al., 2014a; Luckenbach et al., 2014). Siguiendo la nomenclatura utilizada por Luckenbach et al., 2014, en esta tesis se escriben los nombres en minúscula (por ejemplo Abcc2) para designar los transportadores de la

superfamilia ABC en organismos no-mamíferos; mientras que las mayúsculas se utilizan para designar transportadores de mamíferos o para hacer referencias generales.

La importancia ecológica de los transportadores ABC en organismos acuáticos fue reconocida por primera vez por Kurelec, quien demostró que el transportador *Abcb1* protegía a los organismos acuáticos frente a diversos contaminantes. Para denominar este fenómeno acuñó el término de “resistencia a múltiples xenobioticos” (MXR), que sería homóloga a MDR de mamíferos (Kurelec, 1992; Bard, 2000). Varios estudios sobre el metabolismo y transporte muestran que contaminantes, en principio inocuos para los organismos acuáticos, afectan el transporte MXR (Kurelec 1997; Luckenbach et al., 2004; Luckenbach y Epel, 2005). Esto provoca mayor sensibilidad a otras sustancias tóxicas, incluso a bajas concentraciones y puede desencadenar desbalances en el metabolismo. También se ha visto que transportadores MXR como *Abcb1*, *Abcc* y *Abcg2* pueden ser inducidos por sustratos naturales como biotoxinas, dentro de las cuales se encuentra el ácido okadaico (Ritz et al., 1999; Bard et al., 2000; Lozano Paredes, 2013).

Abcb1 fue el primer transportador ABC descrito en organismos acuáticos (Bard, 2000; Sturm et al., 2001). A partir de la descripción molecular de *Abcb1* en el lenguado *Pleuronectes americanus* (Chan, 1992), en los últimos años han aumentado considerablemente los estudios sobre transportadores ABC en numerosos tejidos de peces, a través de técnicas inmunohistoquímica, moleculares y experimentos de transporte. Además, recientemente se han obtenido secuencias génicas para varios transportadores ABC y la familia de genes ABC ha sido caracterizada y analizada filogenéticamente en el pez cebra (*Danio rerio*) y en el bagre de canal (catfish, *Ictalurus punctatus*) (revisión de Luckenbach et al., 2014). No obstante, recientemente Fischer et al. (2013) describieron que en *D. rerio* el transportador *Abcb4* sería funcionalmente similar al transportador ABCB1 de mamíferos pero distinto al ABCB4 (el cual no participa en la defensa celular en mamíferos). Debido

a que estos estudios son recientes y aún no es clara la identidad molecular exacta de estos transportadores en peces, a lo largo de esta tesis se denominarán como transportadores “tipo” Abcb1, Abcc1-4 y Abcg2, a fin de cotejar funciones equivalentes a las de los transportadores de mamíferos.

Abcb1 es el transportador que más se ha estudiado en relación a la eliminación de compuestos tóxicos en organismos acuáticos, aunque las proteínas Abcc también constituyen una parte integral del sistema MXR en los mismos (Zaja et al., 2008; Costa et al., 2012). Más aún, estudios en hepatocitos primarios y en líneas celulares de distintos tejidos de *O. mykiss*, demuestran que la expresión y actividad de proteínas Abcc es más pronunciada que la de Abcb1 (Zaja et al., 2008; Fischer et al., 2011). Por lo que se sugiere que el estudio de la actividad de los transportadores Abcc en peces es importante y requiere mayor atención (Ferreira et al., 2014b).

En cuanto a la localización de los transportadores ABC, a diferencia de mamíferos, donde se conoce que el intestino es uno de los principales sitios de expresión de dichos transportadores (revisión de Oostendorp et al., 2009), en peces, es relativamente poco lo que se conoce sobre la expresión y actividad de transportadores ABC en el sistema gastrointestinal (Luckenbach et al., 2014). En línea celular de intestino de *O. mykiss*, por ejemplo, se observó abundante expresión de ARNm de Abcb1, Abcc2, Abcc3 y Abcg2 mientras que la expresión de ARNm de Abcc1, Abcc4 y Abcc5 fue menor (Lončar et al., 2010). A su vez, de estos transportadores, Abcb1, Abcc2, y Abcg2 mostraron mayores niveles de expresión de ARNm en la región distal que en la proximal del intestino (Lončar et al., 2010).

Detoxificación de MCLR

El primer paso en la detoxificación de MCLR, tanto en mamíferos como en organismos acuáticos, implica la actividad de la enzima GST. Una vez que la MCLR ingresa a la célula, es conjugada con una molécula de GSH en una reacción catalizada por GST, el producto resultante (MC-SG), puede ser eliminado vía

excreción biliar (Kondo et al., 1996; Sahin et al., 1996; Pflugmacher et al., 1998; Ito et al., 2002). A su vez, Kondo et al. (1996), mencionan la posible formación de un derivado de la toxina por epoxidación, seguido de hidrólisis y conjugación con sulfato (en el grupo Adda) y conjugación con GSH (en el grupo Mdha). No obstante, aunque existen evidencias sobre procesos de metabolización y eliminación de MCLR, tanto en estudios a campo como de laboratorio (Sahin et al., 1996; Tencalla y Dietrich, 1997; Williams et al., 1997a,b; Amorim y Vasconcelos, 1999; Ito et al., 2000; Soares et al., 2004; Xie et al., 2004; Cazenave et al., 2005; Smith y Haney, 2006; Ibelings y Chorus, 2007; Sotton et al., 2012; Bieczynski et al., 2013), existen pocos trabajos acerca de la participación de los transportadores ABC en la detoxificación de esta toxina. Los resultados obtenidos en ratones intoxicados con MCLR, MCRR, MC-SG o MC-Cis, indicarían la posible participación de “bombas GS-X” (transportadores ATP-dependientes, que exportan conjugados de glutatión) en el proceso de eliminación de MC-SG, MC-Cis y MCRR (Ito et al., 2002). En la revisión de Malbrouck y Kestemont (2006) también se menciona la posible implicancia de transportadores Mrp (Abcc) en la eliminación de MC-SG. Sin embargo, ninguno de los dos trabajos estudia dicho transporte. Por otro lado, sólo Contardo-Jara et al. (2008) y Amé et al. (2009) estudiaron a nivel molecular y funcional, la participación de otro transportador, Abcb1, en la excreción de MCLR. Por lo tanto, la naturaleza del transportador de fase III responsable de la eliminación de MC es aún un poco clara y, a pesar de la información funcional y molecular disponible sobre los transportadores Abcc en peces (Zaja et al., 2008; Sauerborn Klobučar et al., 2010; Fischer et al., 2011; Long et al., 2011; Luckenbach et al., 2014), estos transportadores no han sido estudiados en relación con el transporte de MCLR. En lo que refiere al transporte de MCLR desde la célula hacia la sangre, no existe ninguna información sobre qué transportadores estarían implicados. Teniendo en cuenta estos antecedentes, resulta interesante analizar la participación de transportadores Abcc en el flujo MCLR, tanto en el lado apical como en el basolateral del epitelio intestinal de los peces.

OBJETIVOS

➤ Identificar y caracterizar los transportadores responsables de la excreción hacia el lumen intestinal y absorción (transporte hacia la sangre) de MCLR en células principales del epitelio intestinal (enterocitos) de *O. hatcheri* y *O. mykiss*, en preparaciones *ex vivo* de las distintas secciones del intestino de *O. hatcheri* y *O. mykiss*.

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

➤ **H1:** Los peces son capaces de limitar la absorción intestinal de MCLR a través de la conjugación con GSH, catalizada por GST, seguida de la exportación del conjugado MC-SG a través de proteínas Abcc ubicadas en la cara luminal del epitelio intestinal.

➤ **P1a:** Al incubar segmentos de intestino de *O. hatcheri* con sustratos específicos para Abcc junto con MCLR, la toxina inhibirá competitivamente el transporte apical de dichos sustratos.

➤ **P1b:** Al incubar segmentos de intestino de *O. mykiss* con sustratos específicos para Abcc junto con MCLR, la toxina inhibirá competitivamente el transporte apical de dichos sustratos.

➤ **H2:** El conjugado MC-SG se transporta desde los enterocitos hacia la sangre a través de proteínas Abcc de ubicación basolateral.

➤ **P2a:** Al incubar segmentos de intestino de *O. hatcheri* con sustratos específicos para Abcc junto con MCLR, la toxina inhibirá competitivamente el transporte basolateral de dichos sustratos.

- **P2b:** Al incubar segmentos de intestino de *O. mykiss* con sustratos específicos para Abcc junto con MCLR, la toxina inhibirá competitivamente el transporte basolateral de dichos sustratos.

- **P3a:** En intestino de *O. hatcheri*, la aplicación conjunta de MCLR e inhibidores específicos de Abcc disminuirá la tasa de eliminación de MCLR, produciendo efectos tóxicos intracelulares característicos de la toxina, como inhibición de PP y/o estrés oxidativo, a concentraciones de MCLR más bajas que las necesarias para producir dichos efectos en ausencia de inhibidores de Abcc.

- **P3b:** En intestino de *O. mykiss*, la aplicación conjunta de MCLR e inhibidores específicos de Abcc disminuirá la tasa de eliminación de MCLR, produciendo efectos tóxicos intracelulares característicos de la toxina, como inhibición de PP y/o estrés oxidativo, a concentraciones de MCLR más bajas que las necesarias para producir dichos efectos en ausencia de inhibidores de Abcc.

METODOLOGÍA

Se realizaron preparaciones *ex vivo* de intestino para evaluar el transporte mediado por proteínas tipo Abcc. La figura 2 muestra parte de las fases de detoxificación y la manera en que los sustratos modelos para Abcc (CDNB y calceína-AM) fueron utilizados en este estudio. En líneas punteadas se indica el camino hipotético planteado en esta tesis para la detoxificación y transporte de MCLR.

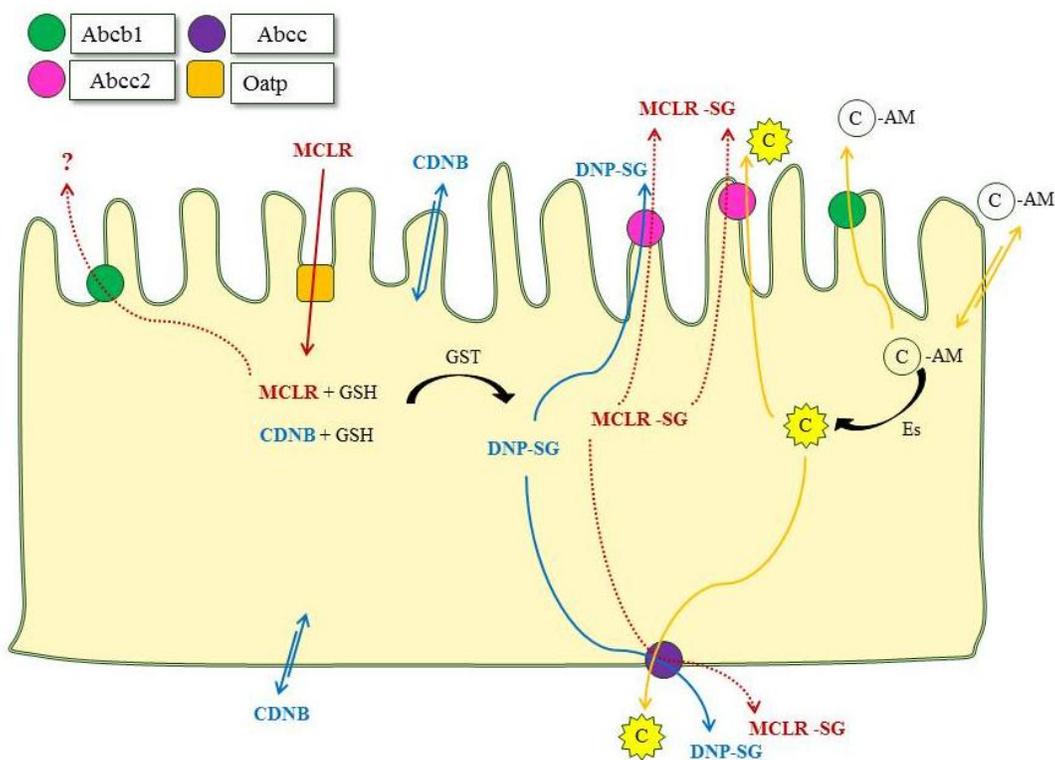


Figura 2. Vías de detoxificación de sustratos de Abcc y caminos posibles propuestos para MCLR. CDNB, 1-cloro-2,4-dinitrobenceno; MCLR, microcistina-LR; GSH, glutatión reducido; DNP-SG, 2,4-dinitrofenil-S-glutation; MCLR-SG, microcistina-LR conjugada con GSH; GST, glutatión S-transferasa; C-AM, calceína acetoximetil éster (no-fluorescente); C, calceína (fluorescente); Es, esterazas; Abcb1, glicoproteína-P; Abcc2, proteína de resistencia a múltiples drogas tipo 2; Abcc, proteínas de resistencia a múltiples drogas de ubicación basolateral; Oatp, polipéptidos transportadores de aniones orgánicos. Las líneas punteadas representan vías de exportación hipotéticas. Las líneas sólidas indican caminos de exportación conocidos.

Preparaciones intestinales

Se utilizaron individuos de *O. mykiss* (n = 82; 141 ± 61 g) y *O. hatcheri* (n = 53; 22,5 ± 7,3 g), manteniéndolos en las condiciones descritas en la metodología general, sección 2. Se utilizaron sacos evertidos, no-evertidos, segmentos y tiras longitudinales de intestino. Para medir la actividad de transportadores Abcc, se utilizó CDNB, el cual se aplicó sólo (control) o combinado con MCLR o MK571 (inhibidor específico de Abcc). Alternativamente, se realizaron experimentos de flujo de calceína. En los experimentos con MK571 se utilizó una solución madre de 3 mM en agua. Las características de estos compuestos y el diseño general de los experimentos se detallan en la metodología general.

Efecto de MCLR en el transporte de DNP-SG

Las secciones media y posterior del intestino de 5 individuos de *O. mykiss* fueron fraccionadas en mitades, una mitad se utilizó como control y otra como tratado (muestras pareadas). De esta forma se prepararon sacos intestinales evertidos y no-evertidos (0,186 ± 0,010 g). Lo mismo se hizo con las secciones anterior, media y posterior de 5 individuos de *O. hatcheri* (0,049 ± 0,002 g).

Los sacos control se mantuvieron en vasos de vidrio con 5 mL de solución salina con 200 µM CDNB (baño), durante una hora. Los sacos de intestino tratados se prepararon de la misma forma pero agregando 5,65 µg MCLR (1,14 µM concentración final) en el baño (sacos intestinales evertidos). Mientras que en los sacos no-evertidos, se agregó la misma cantidad de MCLR disuelta en solución salina en el interior de los mismos. Estas concentraciones se eligieron para lograr una concentración cercana a 72,2 µg MCLR /g de intestino, concentración similar a la aplicada en previos experimentos *in vivo* (Williams et al., 1997a; capítulo 1 de esta tesis).

Cada 10 minutos, se tomaron alícuotas de 2 mL de los baños y se tomaron lecturas a 340 nm en espectrofotómetro, para determinar la cantidad de DNP-SG transportado a lo largo del tiempo. Luego de medir, las alícuotas fueron devueltas

al baño para mantener volúmenes constantes. El DNP-SG transportado en cada preparación se calculó a partir de la pendiente de absorbancia acumulada *vs.* tiempo, el coeficiente de extinción molar del DNP-SG ($9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), el camino óptico de la cubeta (1 cm) y se refirió este resultado a los gramos de tejido. Los resultados correspondientes a cada preparación con MCLR se expresaron como porcentaje respecto del DNP-SG transportado por el respectivo control.

Para medir el efecto concentración-dependiente de MCLR sobre el flujo de DNP-SG, se utilizaron tiras longitudinales ($0,019 \pm 0,006 \text{ g}$) de la sección media del intestino (mediciones repetidas) de 4 individuos de *O. mykiss* y 4 individuos de *O. hatcheri*, las cuales se colocaron en baños de solución salina con CDNB y 0 (control); 0,6; 1,14; 2,3; 3,4; 5,7; 6,8; 8,5 u $11,4 \mu\text{M}$ MCLR (concentración final). El DNP-SG excretado hacia el baño se registró durante una hora, tomando alícuotas cada 10 minutos. La tasa de transporte específica de DNP-SG se expresó como porcentaje del transporte de los respectivos controles. Se graficó tasa de transporte de DNP-SG (como % del control) *vs.* $\text{Log} [\text{MCLR}]$, se calcularon las regresiones no-lineales y se obtuvieron los valores de CI_{50} .

Efectos de MK571 en el transporte de DNP-SG

Se aplicó MK571 en sacos intestinales pareados, evertidos y no-evertidos, obtenidos de las secciones media y posterior de individuos de *O. mykiss*. Un total de 3 sacos evertidos ($0,301 \pm 0,014 \text{ g}$) por concentración de inhibidor se incubaron durante 10 minutos en solución salina con 0; 0,3; 1,5 ó $3 \mu\text{M}$ MK571. Luego, fueron transferidos a baños de $200 \mu\text{M}$ CDNB con la misma concentración de MK571. Los sacos intestinales no-evertidos ($n = 3$ por concentración de inhibidor; $0,406 \pm 0,03 \text{ g}$), fueron tratados sólo con dos concentraciones de MK571, 3 ó $10 \mu\text{M}$, siguiendo el mismo protocolo experimental descrito para los sacos evertidos. Se calculó la tasa de transporte específico de DNP-SG como se describe en la sección anterior y se expresaron los resultados como porcentaje del DNP-SG transportado por el respectivo control.

Además, se evaluó el efecto concentración-dependiente de MK571 sobre el flujo de DNP-SG en tiras intestinales ($0,021 \pm 0,006$ g) de la sección media de intestino de 4 individuos de *O. mykiss* y 4 individuos de *O. hatcheri*, las cuales se colocaron en baños de solución salina con CDNB y 0 (control); 0,6; 1,14; 2,3; 3,4 ó 6,8 μM MK571 (concentración final). El DNP-SG excretado hacia el baño se registró durante una hora, tomando alícuotas cada 10 minutos. La tasa de transporte específico de DNP-SG se expresó como porcentaje respecto del transporte de los respectivos controles. Se graficó la curva tasa de transporte específico de DNP-SG (como % del control) vs. Log [MK571], se calcularon las regresiones no-lineales y se obtuvieron los valores de CI_{50} .

Efectos de MCLR y MK571 en el transporte de calceína

Alternativamente, para estudiar el transporte por Abcc, se realizaron experimentos de flujo de calceína. Las tiras de intestino del segmento medio de 7 individuos de *O. mykiss* (6 tiras por individuo, $0,08 \pm 0,006$ g) y 7 individuos de *O. hatcheri* (6 tiras por individuo, $0,045 \pm 0,003$ g), luego de ser pesadas, se colocaron en tubos de microcentrífuga (2 tiras por tubo), con baños de solución salina de 300 μL con calceína-AM (forma no-fluorescente) a una concentración final de 0,25 μM (Zaja et al., 2008). En los tubos tratados se agregó MCLR o MK571 a concentraciones finales de 2,3 μM y 3 μM , respectivamente. Las tiras tratadas con MK571 fueron previamente incubadas durante 10 minutos en solución salina con el inhibidor, sin calceína-AM.

Efectos tóxicos de MCLR

Se incubaron segmentos evertidos de intestino medio ($0,05 \pm 0,002$ g) de 30 individuos de *O. mykiss*, en vasos de vidrio con 5 mL de solución salina (control), solución salina + 1,14 μM MCLR (MC1); 2,3 μM MCLR (MC2); 3 μM MK571 (MK) ó 1,14 μM MCLR + 3 μM MK571 (MC1/MK). Segmentos ($0,048 \pm 0,004$ g) de la sección media de intestino de 33 individuos de *O. hatcheri*, se incubaron en 5 mL de

solución salina (control), solución salina + 1,14 μM MCLR (MC1); 2,3 μM MCLR (MC2); 6,8 μM MCLR (MC6); 3 μM MK571 (MK); 1,14 μM MCLR + 3 μM MK571 (MC1/MK) ó 6,8 μM MCLR + 3 μM MK571 (MC6/MK). Los segmentos de todos los tratamientos con MK571 fueron incubados previamente durante 10 minutos en solución salina solamente con el inhibidor antes de agregar MCLR.

Luego de una hora de incubación en las correspondientes soluciones, cada segmento se lavó con solución de homogeneización fría y se homogeneizó y centrifugó como se describe en la sección 6 de la metodología general. Los sobrenadantes resultantes se utilizaron para mediciones de actividad enzimática (PP1, PP2A y GST) y para cuantificación de GSH y proteínas totales. Los protocolos de estas mediciones se detallan en la sección 7 de la metodología general.

Otros 9 individuos de *O. mykiss* fueron utilizados para estudiar los efectos concentración dependiente de MCLR en la actividad de la enzima PP1 en presencia o no del inhibidor MK571. Para ello se cortaron tiras longitudinales ($0,038 \pm 0,003$ g) de la sección media de intestino de cada individuo y se trataron con distintas concentraciones de MCLR (mediciones repetidas). Cada tira de intestino se colocó en un vaso de vidrio con 1 mL de solución salina de baño + 0; 1,14; 2,3; 4,5; 9 ó 13,6 μM de MCLR, en presencia de 0; 3 ó 6 μM MK571. Las tiras con MK571 fueron incubadas previamente durante 10 minutos solamente con el inhibidor.

Luego de 1 hora de incubación, todas las tiras en las soluciones correspondientes se lavaron y homogeneizaron en buffer de homogeneización frío y se centrifugaron como se describe en la sección 6 de metodología general. Los sobrenadantes se utilizaron para medir actividad de PP1 endógena.

Análisis estadístico

Las comparaciones entre grupos se realizaron con test de Student (pareado o no pareado), ANOVA de un factor y ANOVA de dos factores para muestras

independientes o de medidas repetidas, según el caso correspondiente. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo (Zar, 1999). Se utilizaron comparaciones *post hoc* de Fischer LSD cuando el ANOVA resultó significativo. Por último, cuando los supuestos de homocedacia (test de Bartlett) y normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) no se cumplieron, los datos se transformaron con Log_{10} .

RESULTADOS

Efectos de MCLR y MK571 en el transporte de DNP-SG

En todos los sacos intestinales, la presencia de $1,14 \mu\text{M}$ de MCLR inhibió significativamente el flujo de DNP-SG, salvo en intestino posterior de *O. hatcheri*, donde no hubo efecto significativo. En los sacos evertidos de *O. mykiss*, la tasa de transporte de DNP-SG disminuyó de $4,3 \pm 0,5$ en el control a $3,1 \pm 0,3$ nmol DNP-SG $\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ en el tratado, en intestino medio y de $7,1 \pm 1,4$ a $4,9 \pm 1,2$ nmol DNP-SG $\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ en intestino posterior ($p < 0,05$ para ambas secciones de intestino). En los sacos no-evertidos de *O. mykiss* la tasa de transporte se redujo de $8,3 \pm 1,2$ a $6,2 \pm 0,8$ nmol DNP-SG $\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ (control y tratado, respectivamente) en intestino medio y de $5,8 \pm 0,6$ a $4,9 \pm 0,3$ nmol DNP-SG $\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ (control y tratado, respectivamente) en intestino posterior ($p < 0,05$ para ambas secciones). En la figura 3a se presentan los resultados como porcentaje de la tasa de transporte de DNP-SG respecto de los controles. La comparación entre los porcentajes de inhibición entre segmentos medio y posterior no resultó significativa para las preparaciones evertidas ni para las no-evertidas ($p > 0,05$).

En los sacos intestinales evertidos de *O. hatcheri*, la tasa de transporte disminuyó de $7,7 \pm 3,9$ a $5,5 \pm 2,8$ nmol DNP-SG $\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ en intestino anterior y de $10 \pm 4,2$ a $5,3 \pm 1,2$ nmol DNP-SG $\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ en intestino medio ($p < 0,05$ para ambas secciones). En intestino posterior las tasas de transporte fueron de $7,5 \pm 0,6$ y $5,4 \pm 0,6$ nmol DNP-SG $\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ($p > 0,05$). En los sacos intestinales no-evertidos de *O.*

hatcheri la tasa de transporte disminuyó de $8,3 \pm 2,7$ a $6,3 \pm 1,6$ nmol DNP-SG $g^{-1}min^{-1}$ ($p < 0,05$) en intestino medio, mientras que en intestino posterior no hubo cambio significativo ($6,2 \pm 0,7$ y $5,4 \pm 0,4$ nmol DNP-SG $g^{-1}min^{-1}$, ($p > 0,05$). Los datos correspondientes a sacos no-evertidos de intestino anterior de *O. hatcheri*, debieron ser descartados por resultar incoherentes, probablemente se hayan incluido porciones de esófago al realizar el corte del segmento, el cual aparentemente no transporta los compuestos de estudio. En la figura 3b se presentan los resultados como porcentaje de la tasa de transporte de DNP-SG respecto de los controles correspondientes.

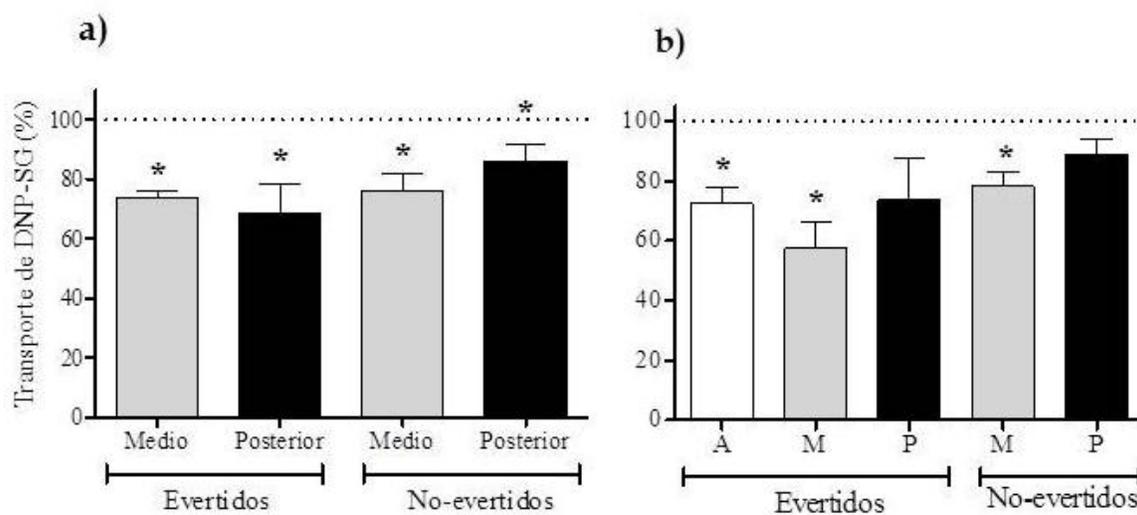


Figura 3. a) Tasa de transporte de DNP-SG (en % del control) en sacos intestinales evertidos y no-evertidos de intestino medio y posterior de *Oncorhynchus mykiss* y **b)** secciones anterior (A), media (M) y posterior (P) del intestino de *Odontesthes hatcheri*. Controles (200 μ M CDNB), tratados (200 μ M CDNB + 1,14 μ M MCLR); $n = 5$. * $p < 0,05$ con respecto a su control.

Los sacos intestinales de *O. mykiss*, evertidos y no-evertidos, incubados con distintas concentraciones de MK571 presentaron inhibición del flujo de DNP-SG respecto de los correspondientes sacos control ($p < 0,05$ y $0,01$, fig. 4). En los sacos evertidos de intestino medio, MK571 produjo un claro efecto inhibitorio concentración dependiente ($p < 0,05$), con porcentajes de inhibición de 25,6%; 51,1% y 76,2% para 0,3; 1,5 y 3 μ M de MK571. En los sacos evertidos de intestino posterior el efecto inhibitorio fue menos marcado (5,1%; 23,4% y 37,8%,

respectivamente) y no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones del inhibidor ($p > 0,05$). En los sacos intestinales no-evertidos, 3 y 10 μM de MK571 causaron inhibición significativa del transporte de DNP-SG (22,4% y 35,3%, respectivamente, en intestino medio, y 20,2% y 40,6%, respectivamente, en intestino posterior).

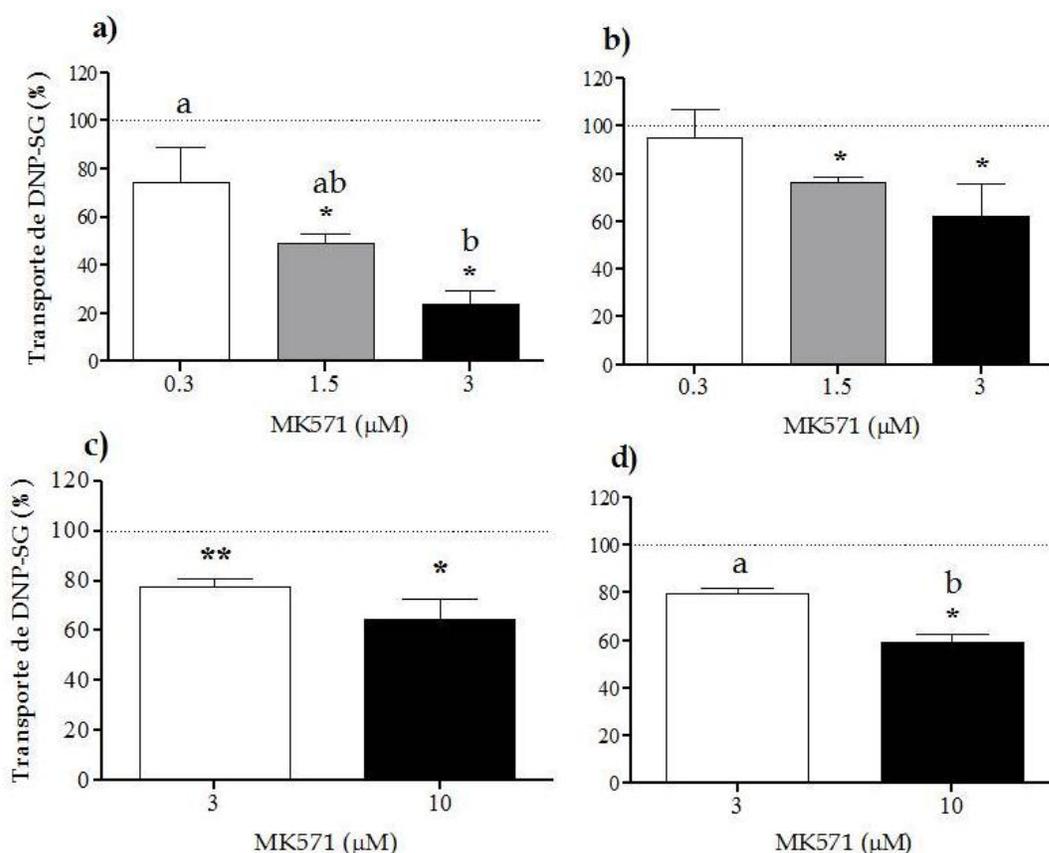


Figura 4. Tasa de transporte de DNP-SG (en % del control) en sacos intestinales de *Oncorhynchus mykiss* incubados con 200 μM CDNB (controles) o 200 μM CDNB + MK571 (tratados). Sacos intestinales **a)** evertidos y **c)** no-evertidos de intestino medio, **b)** evertidos y **d)** no-evertidos de intestino posterior. $n = 3$ por tratamiento. * y ** indican diferencias significativas respecto del control correspondiente ($p < 0,05$ y $0,01$, respectivamente). Las letras indican diferencias significativas entre concentraciones de MK571 ($p < 0,05$).

Las tiras longitudinales de la sección media de intestino, incubadas con distintas concentraciones de MCLR, presentaron un efecto inhibitorio concentración-dependiente sobre el transporte de DNP-SG, tanto en *O. mykiss* como en *O. hatcheri*. MK571 también inhibió el transporte de DNP-SG en forma

concentración-dependiente. Las figuras 5 y 6 muestran las curvas de inhibición de MCLR y MK571 de *O. mykiss* y *O. hatcheri*, respectivamente. *O. mykiss* presentó una CI_{50} de $1,4 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,72$) para MCLR y de $0,2 \mu\text{M}$ para MK571 ($R^2 = 0,86$), mientras que para *O. hatcheri* la CI_{50} para MCLR fue de $3,3 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,75$) y para MK571 fue de $0,6 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0,6$). Se observa, de estos resultados, que los transportadores tipo Abcc de *O. mykiss* son más afines por ambos compuestos, que los de *O. hatcheri*.

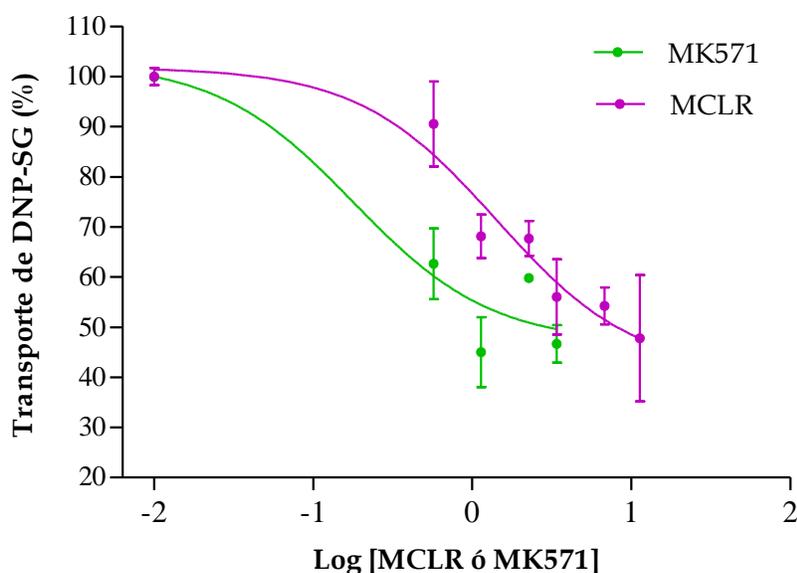


Figura 5. Tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* incubadas con $200 \mu\text{M}$ CDNB + MCLR ó MK571. Regresión no lineal de la Tasa de transporte de DNP-SG (como % del control) vs. Logaritmo de la concentración de MCLR ó MK571, $n = 4$. CI_{50} MCLR= $1,4 \mu\text{M}$, $R^2= 0,72$. CI_{50} MK571= $0,2 \mu\text{M}$, $R^2= 0,86$.

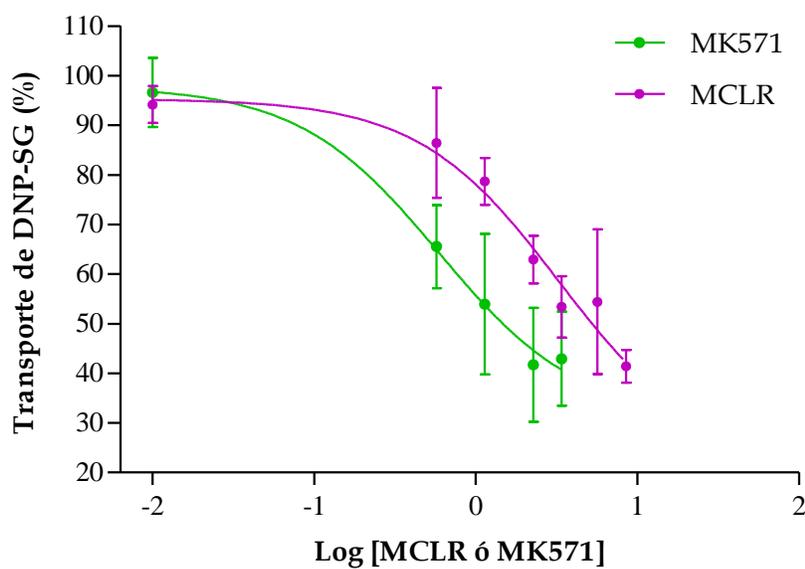


Figura 6. Tiras de intestino medio de *Odontesthes hatcheri* incubadas con 200 μM CDNB + MCLR ó MK571. Regresión no lineal de la Tasa de transporte de DNP-SG (como % del control) vs. Logaritmo de la concentración de MCLR ó MK571, $n = 4$. CI_{50} MCLR = 3,3 μM , $R^2 = 0,75$. CI_{50} MK571 = 0,6 μM , $R^2 = 0,6$.

Transporte calceína en tiras de intestino

El transporte de calceína (detectado por fluorescencia) hacia la solución baño se redujo significativamente en las tiras de intestino incubadas con 2,3 μM MCLR o 3 μM MK571 respecto de los correspondientes controles ($p < 0,05$). Entre tratamientos no se observaron diferencias significativas. Este resultado se obtuvo tanto en las tiras intestinales de *O. mykiss* como en las de *O. hatcheri*, con porcentajes de inhibición de 17,4 % para MCLR y 20 % para MK571, en *O. mykiss* y de 38% para MCLR y 27% para MK571, en *O. hatcheri* (fig. 7).

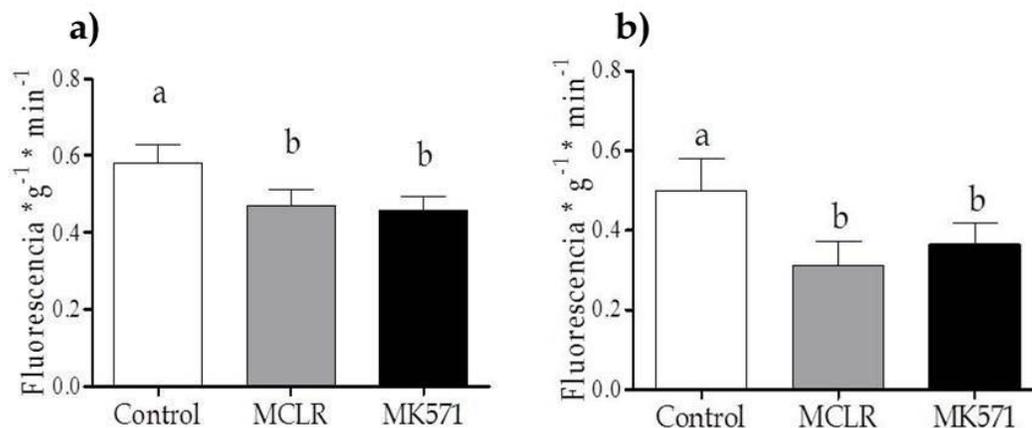


Figura 7. Transporte de calceína (unidades de fluorescencia por gramo de tejido por minuto) en tiras de intestino de (a) *Oncorhynchus mykiss* y (b) *Odontesthes hatcheri*. Control (0,25 μ M calceína-AM), tratados (0,25 μ M calceína-AM + 2,3 μ M MCLR ó 3 μ M MK571); n = 7. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Efectos tóxicos de MCLR

En los segmentos evertidos de intestino medio de *O. mykiss*, se observaron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a la actividad de las enzimas PP1 y PP2A ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente, fig. 8c, d), mientras que la actividad de GST y la concentración de GSH no variaron significativamente entre tratamientos (fig. 8a, b). En los segmentos de intestino incubados con 1,14 μ M MCLR (MC1), no se observaron cambios en ninguna de las variables medidas respecto de los controles, mientras que en las incubadas con 2,3 μ M MCLR (MC2), las actividades de las enzimas PP1 y PP2A resultaron inhibidas significativamente en comparación con la actividad control, 41% y 49% de inhibición, respectivamente. Los segmentos de intestino incubados con MC1/MK también mostraron inhibición del 34% y 38% para PP1 y PP2A, respectivamente ($p < 0,05$). Los segmentos incubados sólo con MK571, presentaron activación significativa de la enzima PP2A (40% respecto del control).

En las tiras de intestino medio de *O. mykiss*, MCLR inhibió la actividad de PP1 en forma concentración-dependiente. En presencia 3 μ M MK571, el efecto

inhibitorio de MCLR fue mayor. Aunque con 6 μM MK571 los resultados fueron más variables, la inhibición fue un poco mayor que con 3 μM MK571. En la figura 9 se observan las regresiones no-lineales de cada tratamiento. Los valores de CI_{50} obtenidos fueron de 1,04 μM ($R^2 = 0,74$) para MCLR y 0,52 y 0,37 μM ($R^2 = 0,86$ y 0,74), para MCLR + 3 μM MK571 y MCLR+ 6 μM MK571, respectivamente. Las tiras intestinales incubadas solamente con 6 μM MK571 no mostraron cambios significativos en cuanto a la actividad PP1.

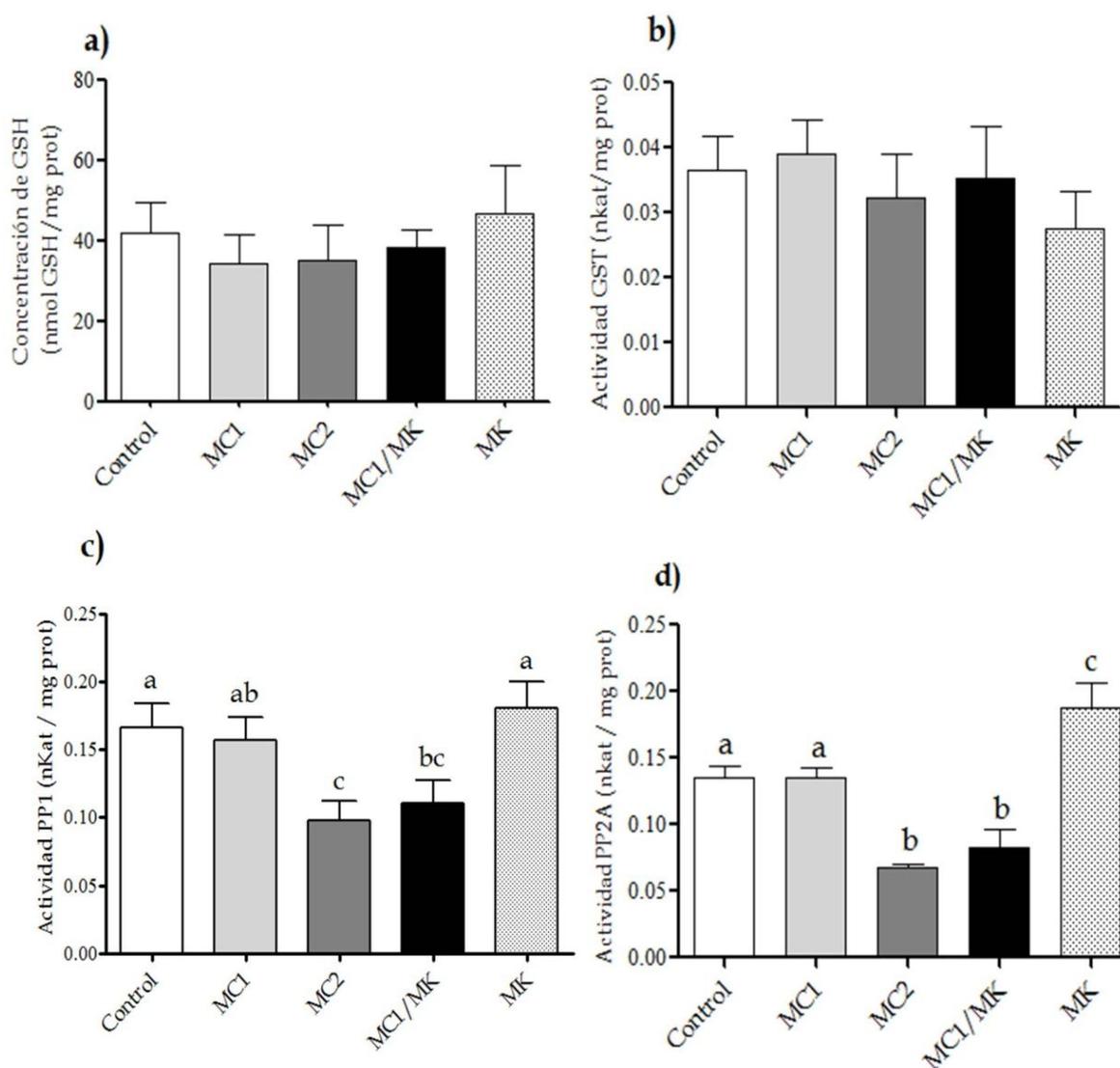


Figura 8. Efectos tóxicos de MCLR en segmentos evertidos de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*. Control; 1,14 μM MCLR (MCL1); 2,3 μM MCLR (MCL2); 1,14 μM MCLR + 3 μM MK571 (MCL1/MK) y 3 μM MK571 (MK), $n = 5-7$. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). a) Concentración intracelular de GSH, b) Actividad de GST, c) Actividad de PP1, d) Actividad de PP2A.

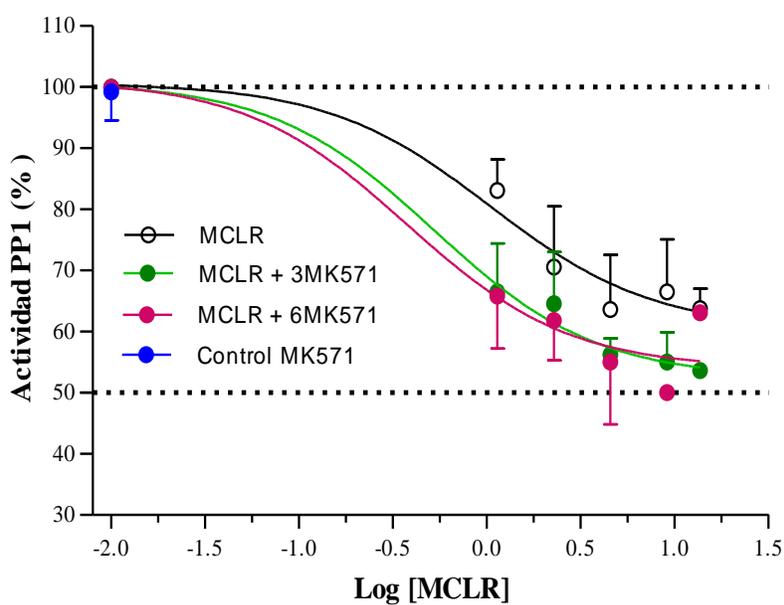


Figura 9. Tiras longitudinales de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* incubadas con MCLR, MCLR + 3 μM ó 6 μM MK571. Regresión no lineal de actividad de la enzima PP1 endógena (como % del control) vs. Logaritmo de la concentración de MCLR; $n = 9$.

En los segmentos de intestino medio de *O. hatcheri* no se observaron cambios significativos en las variables medidas respecto de los controles en los tratamientos con MC1, MC2 ó MK571. Por lo tanto, se realizaron segmentos intestinales incubados con mayor concentración de MCLR (6 μM MCLR y 6 μM MCLR + 3 μM Mk571). Sin embargo, tampoco se observaron efectos tóxicos a estas concentraciones de MCLR (fig. 10a-d). Lamentablemente no se pudo medir GSH en los tratamientos con 6 μM MCLR.

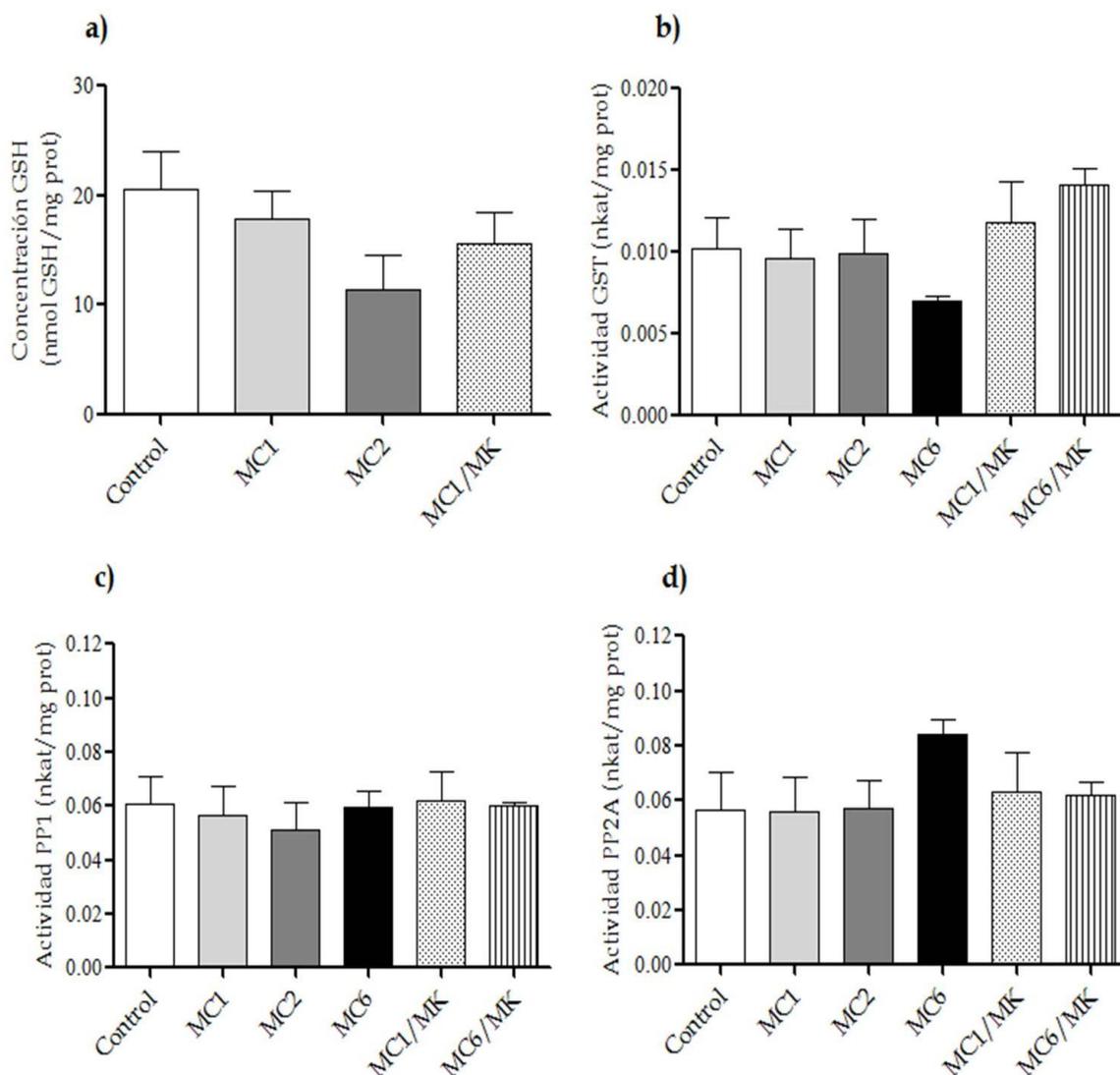


Figura 10. Efectos tóxicos de MCLR en segmentos evertidos de intestino medio de *Odontesthes hatcheri*. Control; 1,14 μ M MCLR (MC1); 2,3 μ M MCLR (MC2); 6,8 μ M MCLR (MC6); 1,14 μ M MCLR + 3 μ M MK571 (MC1/MK) y 6,8 μ M MCLR + 3 μ M MK571 (MC6/MK); $n = 4-7$. **a)** Concentración intracelular de GSH, **b)** Actividad de GST, **c)** Actividad de PP1, **d)** Actividad de PP2A.

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que son muy pocos los antecedentes en cuanto al transporte de MCLR a través de la membrana celular, en este capítulo se buscó determinar la participación de transportadores tipo Abcc en la excreción y/o absorción de esta toxina, en las diferentes secciones del intestino de *O. mykiss* y *O.*

hatcheri. La actividad de estos transportadores se evaluó utilizando DNP-SG y calceína como sustratos modelo, en conjunto con el inhibidor específico, MK571, en distintas preparaciones *ex vivo* de intestino.

Los resultados obtenidos muestran que MCLR reduce significativamente el flujo de DNP-SG, tanto en el lado luminal como en el serosal del epitelio y esto se observa en todas las secciones intestinales de *O. hatcheri* (P1a, P2a) y *O. mykiss* (P1b, P2b). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las secciones intestinales, que permitieran realizar una caracterización del intestino en cuanto a la distribución de los sitios de mayor absorción o detoxificación de MCLR. En este sentido, la única diferencia notable se observó en la sección posterior del intestino de *O. hatcheri*, donde la inhibición del flujo de DNP-SG por MCLR, tanto en sentido luminal como serosal, no alcanzó a ser significativa. Por lo tanto, se podría pensar que el intestino posterior es importante en cuanto al transporte de MCLR por transportadores tipo Abcc en *O. mykiss* pero no en *O. hatcheri*. En *O. hatcheri* esto podría deberse a una menor absorción de MCLR en la sección posterior o a menos afinidad de los transportadores tipo Abcc por esta toxina en dicha región. Debido a que el transporte de DNP-SG no difiere respecto de los otros segmentos, no es esperable que se deba a menor cantidad de transportadores Abcc o diferencias de afinidad por el DNP-SG entre secciones.

A pesar de que no se midió directamente flujo de MCLR o MC-SG, la inhibición competitiva y concentración-dependiente del flujo de DNP-SG por MCLR sugiere que MCLR es exportada a través de proteínas tipo Abcc, tanto en *O. mykiss* como en *O. hatcheri*. Además, la inhibición concentración-dependiente producida por MK571 confirma que al menos una parte del DNP-SG se transporta por proteínas tipo Abcc. Los experimentos de este capítulo no permiten descartar la participación de otros transportadores de importancia en eliminación de compuestos tóxicos hacia la luz del intestino, como Abcb1 o Abcg2, en la eliminación de MCLR. Sin embargo, el sustrato de Abcc utilizado en estos

experimentos (DNP-SG) no ha sido relacionado con dichos transportadores (Chan et al., 2004).

También se evaluó el efecto inhibitorio de MK571 en sacos intestinales evertidos y no-evertidos de las distintas secciones intestinales de *O. mykiss*, para evaluar la localización del efecto producido. MK571 inhibió el transporte de DNP-SG en ambos tipos de preparación, con mayor efecto en los sacos intestinales evertidos de la sección media. Esta diferencia en la sensibilidad a MK571 podría implicar mayor afinidad por el inhibidor de los transportadores tipo Abcc apicales en dicha sección. De acuerdo a la literatura, en la membrana apical del enterocito, se espera encontrar sólo Abcc2, mientras que del lado basolateral, el transporte puede estar mediado por diferentes Abcc, como 1, 3, 4 y 5 (Cai et al., 2003; Chan et al., 2004; Klaassen y Aleksunes, 2010; Lončar et al., 2010; Luckenbach et al., 2014), los cuales podrían tener distintas afinidades por MK571 y/o por DNP-SG.

Una limitación metodológica para interpretar que la disminución del flujo de DNP-SG en presencia de MCLR se debe a que ambos compuestos son transportados por proteínas Abcc, radica en que MCLR podría competir con el CDNB como sustrato de la conjugación con GSH mediada por la enzima GST. De esta forma disminuiría la tasa de formación de DNP-SG, con la consiguiente reducción de transporte por proteínas tipo Abcc. Para descartar esta posibilidad, se evaluó el efecto de MCLR sobre el transporte tipo Abcc utilizando calceína-AM, cuya metabolización a calceína (fluorescente, sustrato de Abcc) es independiente de GST. En estos experimentos, la toxina inhibió el flujo de calceína de manera similar a la inhibición producida en el flujo de DNP-SG. Más aún, concentraciones similares de MCLR y MK571 inhibieron el flujo de calceína en proporción similar.

El transportador Abcb1 ha sido sugerido en trabajos anteriores como posible responsable del transporte de MCLR (Contardo-Jara et al., 2008; Amé et al., 2009). Este transportador exporta calceína-AM (en su forma nativa no fluorescente) pero no calceína (Takano et al., 2006). El transporte de calceína-AM tiende a disminuir la cantidad de producto fluorescente en el interior celular. Si MCLR inhibiera la

actividad de proteínas tipo Abcb1, se esperaría un aumento de la concentración intracelular de calceína-AM y, por consiguiente, de calceína. Este aumento en la concentración de sustrato llevaría a mayor actividad de transporte por proteínas tipo Abcc y a una subestimación de los efectos de MCLR en la actividad de los transportadores tipo Abcc. Esto quiere decir que, no es posible descartar el transporte de MCLR a través de Abcb1, aunque la reducción en el transporte de calceína observada en los experimentos de este capítulo no puede deberse a inhibición de la actividad de esa proteína. En el mismo sentido, Abcg2 no transportaría calceína-AM (Chan et al., 2004) y no ha sido relacionado hasta ahora con el transporte de MCLR.

Hasta el momento, se conoce muy poco sobre la identidad de las proteínas responsables de la excreción de MCLR en la mucosa intestinal o en otros tejidos y no hay antecedentes sobre cuáles serían las proteínas implicadas en el transporte basolateral (hacia la sangre) de esta toxina. Contardo-Jara et al. (2008) y Amé et al. (2009) estudiaron la posible participación de Abcb1 en la excreción de MCLR en animales acuáticos. Los primeros autores describen un aumento en la expresión de ARNm de Abcb1 (aunque no es estadísticamente significativo), en branquias del mejillón *Dreissena polymorpha* previamente expuestas a MCLR. También observan un incremento en la excreción de rodamina B en todo el animal, resultado que asignan a la actividad de Abcb1. Amé et al. (2009) describieron inducción de la expresión génica de Abcb1 en branquias, cerebro e hígado del pez *Jenynsia multidentata* expuesto a MCLR. En otro tipo de estudio, De Souza Votto et al. (2007) evaluaron la capacidad de MCLR de producir estrés oxidativo en líneas celulares humanas con y sin fenotipo MDR (definido como la sobreexpresión de ABCB1) y encontraron que las líneas celulares MDR eran más resistentes a MCLR, aunque no pudieron asociar esta resistencia a la expresión de ABCB1. En cambio estos autores sugieren una alta competencia antioxidante en el fenotipo MDR y un elevado contenido de tubulina- α , que preservaría el citoesqueleto.

Existe abundante información sobre la expresión génica y caracterización funcional de proteínas Abcc y otras ABC para varias especies de peces, incluyendo a *O. mykiss* (Masereeuw et al., 2000; Sturm et al., 2001; Miller et al., 2002; Cai et al., 2003; Caminada et al., 2008; Zaja et al., 2008; Sauerborn Klobučar et al., 2010; Fischer et al., 2010, 2011; 2013; Long et al., 2011; Ferreira et al., 2014 a,b; revisión de Luckenbach et al., 2014), sin embargo, hasta ahora, los Abcc no han sido relacionados con la eliminación de MCLR, con la posible excepción de los trabajos de Ito et al., (2002) y de Malbrouck y Kestmont, (2006), quienes sugirieron que los conjugados de MC-SG podrían ser excretados a través de bombas de transporte GS-X o Mrp, respectivamente. Abcc y Abcb1 han sido caracterizados en tejido intestinal y en líneas celulares permanentes derivadas de intestino de *O. mykiss* (Lončar et al., 2010; Zaja et al., 2008; Fischer et al., 2011). Como se mencionó en la introducción, en hepatocitos primarios y líneas celulares de distintos órganos de *O. mykiss*, la expresión y actividad de proteínas Abcc es más pronunciada que la de Abcb1 (Zaja et al., 2008; Fischer et al., 2011). Sin embargo, los transportadores Abcc han sido menos estudiados que Abcb1 y, en general, ambos tipos de transportadores han sido poco estudiados en intestino de peces y en cuanto al papel que cumplen frente a compuestos tóxicos.

Para confirmar la implicancia de transportadores tipo Abcc en el transporte de MCLR, se estudiaron los efectos intracelulares de esta toxina en segmentos evertidos de intestino medio de *O. mykiss* y *O. hatcheri*, aplicando la toxina de manera individual o en presencia de MK571. En *O. mykiss*, se observó que la concentración de 1,14 μM MCLR (MC1), la misma concentración que inhibió en un 27% el transporte de DNP-SG en sacos evertidos de intestino medio (ver experimentos de transporte de DNP-SG), no afectó ninguno de los parámetros medidos en este experimento (actividad de enzimas GST, PP1 y PP2A, concentración de GSH). Cuando se incrementó al doble la concentración de MCLR (MC2), se produjo una inhibición significativa de la actividad de las enzimas PP1 y PP2A. Estas enzimas han sido descriptas como el blanco principal de MCLR

(Carmichael, 1994; Dawson, 1998; Hooser, 2000), por lo tanto, el efecto observado es un buen indicador de la presencia de dicha toxina en el interior del enterocito. Se ha descrito que PP2A es más sensible a MCLR que PP1 (Heresztyn y Nicholson, 2001; Wiegand y Pflugmacher, 2005); sin embargo, en este trabajo, la inhibición de ambas enzimas fue similar. Cuando se aplicó la concentración MC1 combinada con el inhibidor de Abcc MK571 (MC1/MK), se obtuvo un efecto inhibitorio similar al de MC2 sobre las dos PP, mientras que la aplicación de MK571 sola no inhibió dichas enzimas, por el contrario, la actividad de PP2A se vio incrementada en un 40 % respecto de la actividad control. Este resultado inesperado podría deberse a regulaciones intracelulares provocadas por el inhibidor pero hacen falta más datos para una correcta interpretación. Sin embargo, queda claro que la inhibición de la enzima, observada en el tratamiento MC1/MK, no es producto del inhibidor.

Estos resultados sugieren fuertemente que MCLR es transportada fuera de la célula por proteínas tipo Abcc, ya que la inhibición de estos transportadores por MK571 incrementaría la concentración intracelular de la toxina hasta un nivel en el que resulta inhibitorio para PP1 y 2A. Estos efectos tóxicos observados en *O. mykiss*, incrementados en presencia de MK571, coinciden con lo esperado (P3b).

Una explicación alternativa para estos resultados sería que MK571 tuviera un efecto estimulante sobre la actividad de los transportadores Oatp, por los que MCLR ingresa a la célula (Boaru et al., 2006), incrementando la concentración intracelular de MCLR. Sin embargo, no existen antecedentes sobre la estimulación de Oatp por MK571. Por el contrario, un trabajo reciente, en líneas celulares humanas, describe la inhibición de tres formas de OATP con MK571 (Karlsgren et al., 2012).

El efecto inhibitorio concentración-dependiente de MCLR sobre la actividad de PP1, en conjunto con el aumento en la inhibición que se observa cuando la toxina es aplicada junto con MK571, refuerza la evidencia a favor de un transporte de MCLR mediado por Abcc. También resulta notorio que la diferencia entre

agregar 3 o 6 μM de MK571 produce sólo un ligero incremento en la inhibición, sugiriendo que la concentración 3 μM se encuentra cerca del *plateau* en el efecto inhibitorio. Además, con 6 μM MK571 se obtuvieron resultados poco consistentes, tal vez relacionados con inhibición de Oatp a esta concentración de MK571 (Karlgrén et al., 2012), lo que podría haber disminuido el ingreso de MCLR a la célula.

Existe consenso en la bibliografía sobre la conjugación con GSH catalizada por GST, como primer paso en la detoxificación de MCLR (Pflugmacher et al., 1998). Sin embargo, en los experimentos de esta tesis, no se observaron alteraciones significativas en la actividad de la enzima GST ni en la concentración de GSH, causadas por los tratamientos con MCLR o MCLR-MK571. La falta de inhibición de GST refuerza los resultados de los experimentos de transporte de DNP-SG, ya que la inhibición de dicho transporte en presencia de MCLR no podría deberse a una disminución en la tasa de formación de DNP-SG, sino a la inhibición competitiva del transportador. Se ha postulado que la concentración de GSH podría disminuir en respuesta a MCLR, no solo por la conjugación MCLR-GSH, sino también porque el ingreso de la toxina a la célula, mediado por Oatp, involucraría un contratransporte con GSH (Amado y Monserrat, 2010). Sin embargo, al igual que en los resultados obtenidos en este capítulo, en otros trabajos con peces tampoco se observan cambios en la concentración de GSH causados por MCLR (Malbrouck et al., 2004; Atencio et al., 2008). Se podría especular que la reserva y/o la velocidad de síntesis de GSH en los enterocitos de *O. mykiss* es suficientemente grande como para evitar una reducción significativa de la concentración de este compuesto. También podría ocurrir un incremento compensatorio de la actividad de síntesis de GSH frente al consumo del mismo.

En los segmentos de intestino de *O. hatcheri* incubados con distintas concentraciones de MCLR y/o MK571, no se observaron efectos tóxicos significativos en los parámetros medidos, incluso a concentraciones de MCLR mayores que las aplicadas en *O. mykiss* (no se cumple P3a). Considerando este

resultado junto con los efectos de MCLR sobre el transporte de DNP-SG (CI_{50} 1,4 y 3,3 μ M MCLR, para *O. mykiss* y *O. hatcheri*, respectivamente), se podría concluir que el intestino de *O. hatcheri* es menos sensible a MCLR, tanto en el transporte por Abcc como en los efectos tóxicos (coincidiendo este resultado con lo observado en el capítulo I). A pesar de que en las secciones intestinales de *O. hatcheri* se observó inhibición del flujo de los sustratos de Abcc (DNP-SG y calceína), en el experimento de efectos tóxicos no se pudo confirmar que MCLR se exportara por dichos transportadores. Sin embargo, a partir de los efectos en el transporte de DNP-SG y calceína, se puede especular que el transporte de MC-SG sería mediado por proteínas tipo Abcc y que otros mecanismos en el metabolismo de la toxina, causando la falta de efectos tóxicos en los parámetros medidos. Estos resultados, junto con la falta de efectos tóxicos en intestino de MCLR aplicada *in vivo* (capítulo I), se discuten en consideraciones finales. Al igual que para MCLR, la CI_{50} de MK571 para el transporte de DNP-SG también fue mayor en *O. hatcheri* que en *O. mykiss* (0,6 y 0,2 μ M, respectivamente), indicando menor afinidad de los transportadores tipo Abcc en *O. hatcheri*, tanto por MCLR como por MK571.

CAPÍTULO III

**Efectos de microcistina-LR en la composición de
glicoconjugados y en la localización de
proteínas tipo ABC en intestino de
*Odontesthes hatcheri***

INTRODUCCIÓN

La histoquímica se basa en métodos físicos y químicos aplicados sobre preparados histológicos para determinar la localización *in situ* de diferentes compuestos químicos de las células y tejidos. Dentro de estas técnicas, las lectinas y anticuerpos son herramientas muy útiles para la localización de glicoconjugados y otros componentes específicos, respectivamente. En este capítulo, mediante lectina-histoquímica, se evaluaron los efectos de MCLR sobre la composición de glicoconjugados en la mucosa intestinal de *O. hatcheri*. Además, se intentó caracterizar la defensa MXR en esta especie mediante la utilización de anticuerpos específicos contra los transportadores Abcb1, abcc2, abcc4 y Abcg2.

Características anatómicas e histológicas del sistema digestivo de O. hatcheri

O. hatcheri posee una boca protractil, placas dentarias faríngeas y un esófago corto musculo-membranoso, que se continúa directamente con el intestino, sin un estómago definido. En la primera región del intestino, se encuentra la desembocadura del conducto colédoco, por lo que toda la digestión ocurre en intestino. En la porción final del intestino, se encuentra una válvula intestinal cuya función es la de prolongar la digestión y actuar como órgano activo en la evacuación (Compagnucci et al., 1992).

A nivel histológico, son escasos los estudios en esta especie; sin embargo, existe abundante información sobre *O. bonariensis*, especie de parentesco más cercano. A continuación se describen las características histológicas del tracto digestivo de *O. bonariensis* (Agelet et al., 2003; Castagnino, 2005), que se tomaron como referencia para los estudios realizados en esta tesis sobre el intestino de *O. hatcheri*.

La pared intestinal se compone de las siguientes capas:

Túnica mucosa: conformada por numerosos pliegues revestidos por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, con células caliciformes y microvellosidades (chapa estriada). En estas estructuras epiteliales, están presentes glicoconjugados (moléculas que incluyen hidratos de carbono en su estructura), que forman una capa mucosa sobre el epitelio denominada glicocálix, de gran importancia en la protección del intestino como así también en procesos digestivos. La túnica mucosa se continúa por un tejido conectivo laxo, que se vuelve más denso al aproximarse a la túnica muscular pero, debido a que no existe una muscular de la mucosa, que delimite la túnica mucosa del tejido conectivo, no se distingue una clara túnica submucosa.

Túnica muscular: compuesta por una capa de tejido muscular liso, que se dispone como capa circular interna y longitudinal externa. Entre ambas capas se encuentran plexos nerviosos.

Túnica serosa: capa muy delgada de tejido conectivo laxo y mesotelio.

Histológicamente, se observan diferencias a lo largo del intestino, que permiten definir tres secciones (Agelet et al., 2003; Castagnino, 2005), principalmente por las características de la mucosa. En la sección anterior del intestino, se observan pliegues altos, ramificados y en gran número, ocupando casi por completo la luz intestinal. La segunda sería una sección de transición (Vigliano com. pers.), donde la mucosa presenta pliegues más delgados y cortos. En la parte posterior se observan pliegues simples. El número de células caliciformes es notablemente mayor en esta última sección (Castagnino, 2005). También se ha caracterizado el intestino en tres secciones, según diferencias detectadas por lectina-histoquímica, que coinciden con las curvaturas externas del órgano (Castagnino, 2005). Por otra parte, y en base a las características histológicas, algunos autores han sugerido que la sección anterior del intestino de *O. bonariensis*

tendría función similar a la de un estómago (Castagnino, 2005; Vigliano et al., 2011).

En general, la presencia de mucus es una característica común en el tracto digestivo de los teleósteos al igual que en otros vertebrados. El mucus recubre la superficie apical de los enterocitos, conformando el glicocálix. Esta capa consiste en un gel altamente hidratado, formado en un 95% por agua y un 5% de mucinas, más algunos componentes como electrolitos (Díaz et al., 2008). Las mucinas, son glicoproteínas de gran peso molecular, que forman geles glicosilados (Schumacher et al., 2004). Están formadas por proteínas y lípidos unidos a oligosacáridos y polisacáridos. En vertebrados, estas glicoproteínas tienen numerosas funciones como lubricación, protección frente a microorganismos y frente a la degradación proteolítica, etc. (Díaz et al., 2008; Johanssen et al., 2013). El papel que desempeñan es crucial para mantener el correcto funcionamiento del epitelio intestinal. En peces, además, poseen función osmorregulatoria (Loretz, 1995).

Al igual que en otros vertebrados, estudios realizados en peces óseos (Fiertak y Kilarski, 2002) han demostrado que la presencia y distribución de glicoconjugados varía a lo largo de las diferentes regiones del sistema digestivo y entre distintas especies (Díaz et al., 2008). A su vez, los cambios en la distribución de glicoconjugados sirven como indicativos de la edad, dieta, infecciones parasito-bacterianas, alteraciones de las membranas celulares, etc. (Zanuzzi et al., 2010).

En el caso de *O. hatcheri*, no existen hasta el momento estudios sobre las características de los glicoconjugados del tracto digestivo, y menos aún en relación con la intoxicación con MCLR, aunque esta toxina ha sido relacionada con alteraciones histopatológicas en intestino de peces y mamíferos (revisión de Malbrouck y Kestemont, 2006).

Efectos tóxicos de MCLR en el epitelio intestinal

Existen trabajos, tanto en mamíferos como en peces, que describen alteraciones en la estructura de tejidos, en respuesta a MCLR. La mayoría

describen cambios a nivel histológico en hígado, que es el órgano más estudiado con respecto a los efectos tóxicos de las MC y el primero en el que se detectaron alteraciones histopatológicas (Falconer et al., 1981; Kotak et al., 1996; Tencalla y Dietrich, 1997; Ito et al., 2002; Guzman y Solter, 2002; Atencio et al., 2008). También se han descrito efectos en riñón, branquias e intestino, siendo los estudios en este último órgano poco abundantes (revisión de Malbrouck y Kestemont, 2006).

En el tracto digestivo de *Cyprinus carpio*, se observaron alteraciones patológicas transcurridas 12 horas desde la alimentación forzada con células tóxicas de *M. aeruginosa* (Fischer y Dietrich, 2000). Se observaron núcleos picnóticos y células apoptóticas cubriendo la mucosa intestinal. Las alteraciones fueron aumentando en severidad, llegando a presentar desprendimiento de células, en algunos casos hemorragias localizadas hasta las 24 horas. A partir de este tiempo, se comenzó a observar una disminución en la severidad de los efectos tóxicos. En *Coregonus lavaretus* intoxicado mediante alimentación forzada con *Planktothrix rubescens*, cianobacteria productora de MC, se observó degeneración del epitelio, pérdida de la estructura de la mucosa, vellosidades deshilachadas, exfoliación de células epiteliales, lisis celular generalizada, infiltración de leucocitos y depósitos de proteínas en el lumen del intestino posterior. Al igual que en *C. carpio*, estas alteraciones fueron predominantes a las 24 horas post-intoxicación, tiempo a partir del cual fueron decreciendo los efectos tóxicos hasta no ser evidentes a nivel histológico a las 72 horas (Ernst et al., 2006). En *Tinca tinca* expuesta por vía oral a *Microcystis sp.*, se observó enteritis catarral, enterocitos vacuolados, núcleos picnóticos y, en los casos más severos, pérdida total de la microvellosidad (Atencio et al., 2008).

Transportadores ABC en peces

Técnicas inmunohistoquímicas, funcionales y moleculares han permitido detectar proteínas ABC en peces, homólogas a las de mamíferos. Sobre todo, se ha

descripto la presencia de Abcb1a/b, Abcc1-5, y Abcg2 en tejidos y líneas celulares (revisiones de Ferreira et al., 2014a; Luckenbach et al., 2014). También se dispone de la secuencia génica de varias de estas proteínas para varias especies de peces. Sin embargo, son muy pocos los trabajos en los que se estudiaron la presencia y las funciones de proteínas ABC en el tracto digestivo de los peces. Estudios moleculares en tejidos de *O. mykiss* revelaron alto nivel de expresión de ARNm de los transportadores Abcb1, Abcc2, Abcc3 y Abcg2 en el intestino, mientras que Abcc1, Abcc4, Abcc5 se expresaban en menor proporción (Lončar et al., 2010). De estos transportadores, Abcb1, Abcc2 y Abcg2 mostraron altos niveles de ARNm en la región distal del intestino en comparación con la proximal (Lončar et al., 2010). Mediante PCR en tiempo real, se cuantificó la expresión de transportadores ABC en líneas celulares de *O. mykiss* (Fischer et al., 2011). Entre las líneas celulares estudiadas (dentro de las cuales se encontraba una línea de intestino) el patrón de expresión fue similar. La mayor expresión fue de Abcc1-5 > Abcg2 > Abcb1a/b. Dentro de los Abcc, Abcc4 y 5 estaban expresados moderadamente.

En cuanto a la localización en la membrana celular y como se mencionó en el capítulo II, en enterocitos de mamíferos ABCB1, ABCC2 y ABCG2 tienen ubicación apical, mientras que ABCC1 y 3 son basolaterales. En peces, existen antecedentes de estudios funcionales y de estudios inmunohistoquímicos sobre la ubicación apical de Abcb1 y Abcc2 en túbulo proximal de riñón, intestino, túbulos de glándula rectal de tiburón, membrana canalicular de hígado, entre otros tejidos (Hemmer et al., 1995; Sussman-Turner and Renfro, 1995; Miller et al., 1998, 2007; Kleinow et al., 2000; Masereeuw et al., 2000; Albertus y Laine, 2001; Long et al., 2011; Ferreira et al., 2014a). Para otros transportadores ABC la información disponible en peces se limita a estudios de expresión génica y aún no se ha descripto la localización en la membrana celular. Algunos investigadores sugieren que la localización de transportadores ABC en peces seguiría un patrón similar al de mamíferos, es decir Abcb1, Abcc2 y Abcg2 serían de ubicación apical en células

polarizadas, cumpliendo con un papel defensivo y secretor, mientras que otros Abcc serían basolaterales (Ferreira et al., 2014a).

En cuanto a ABCC4, su localización está poco estudiada. En túbulos renales de mamíferos y peces, se ha sugerido la localización de ABCC4/Abcc4 en la membrana apical (Reichel et al., 2007; Klaassen y Aleksunes, 2010), mientras que en hepatocitos, células tubuloacinares de próstata y plexo coroideo de mamíferos tendría ubicación basolateral (Redzic, 2011). En intestino, la información existente sobre ABCC4/Abcc4 es muy escasa para mamíferos e inexistente para otros vertebrados. Belinsky et al. (2007) y Oostendorp et al. (2009) describen a este transportador como de ubicación apical en el yeyuno, mientras que en una línea celular de colon (HT29-CL19A), se lo ha localizado tanto en membrana apical como basolateral (Li et al., 2007). En otra línea celular de colon (Caco2), ABCC4 se encontró en la membrana basolateral (Ming y Thakker, 2010). Resultados de estudios funcionales realizados en intestino de mamífero, indican presencia basolateral de Abcc4 en enterocitos (de Waart et al., 2012).

OBJETIVOS

- ✓ Evaluar posibles cambios en la composición de glicoconjugados del epitelio intestinal de *O. hatcheri* en respuesta a la exposición a MCLR.

- ✓ Detectar mediante inmunohistoquímica la presencia y localización celular de algunos transportadores ABC importantes en la defensa frente a xenobióticos (Abcb1, Abcc2, Abcc4, Abcg2) en intestino de *O. hatcheri*.

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

- **H1:** MCLR afecta el funcionamiento de la mucosa intestinal de *O. hatcheri* provocando cambios en la producción y secreción de glicoconjugados.
 - **P1:** Al aplicar lectinas específicas en tejidos de intestino provenientes de individuos de *O. hatcheri* previamente expuestos a MCLR, se observarán diferencias de reacción de las mismas con respecto a los tejidos de peces control.

- **H2:** Las proteínas ABC participan en el transporte de MCLR a través del epitelio intestinal, por lo que deben estar presentes en las membranas apical y basolateral de enterocitos de las secciones de intestino que transporten esta sustancia y su expresión en membrana puede modificarse luego del tratamiento con MCLR.
 - **P2a:** En los peces tratados con MCLR aumentará la expresión de transportadores tipo Abcc2, Abcb1 y/o Abcg2 en la membrana apical.
 - **P2b:** En los peces tratados con MCLR aumentará la expresión de transportadores tipo Abcc4 en la membrana basolateral

METODOLOGÍA

Exposición de O. hatcheri a MCLR

Se utilizaron ejemplares de *O. hatcheri*, distribuidos en 2 acuarios (n = 4 por acuario; $14,16 \pm 0,55$ g), mantenidos según las condiciones descritas en la metodología general (sección 2). Se llevó a cabo una exposición aguda de individuos de *O. hatcheri* a una dosis sub-letal de MCLR (peces tratados), a través de una única administración de alimento comercial al cual se le adicionó MCLR. El alimento tóxico se preparó al igual que en el capítulo I, sólo que en vez de partir de MCLR proveniente de un cultivo de *M. aeruginosa*, se utilizó el extracto tóxico obtenido de una floración natural de cianobacterias. Las concentraciones tóxicas fueron de $2 \mu\text{g MCLR g}^{-1} \text{mc}$ (dosis baja) y $5 \mu\text{g MCLR g}^{-1} \text{mc}$ (dosis alta). Visualmente, se controló que cada pez ingiriera alimento y que todo el alimento fuera consumido. Luego de 24 h, todos los individuos fueron sacrificados mediante decapitación, el intestino de cada individuo fue inmediatamente removido y guardado en solución fijadora para histología.

Histología

Se tomaron muestras de las 3 secciones del tracto intestinal: anterior (desde el píloro hasta la primera curva intestinal), media (porción entre las dos curvaturas intestinales) y posterior (desde la segunda curvatura hasta el final del tracto digestivo, descartando la válvula caudal). Porciones de tejido de estas secciones, de aproximadamente 5 mm, fueron fijadas en Bouin, 1 h a 4°C y luego 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente, se aclararon en butanol y se incluyeron en parafina. De los tacos resultantes se obtuvieron cortes de $4 \mu\text{m}$, los cuales fueron montados en portaobjetos (descripción en sección 10 de metodología general). Estos cortes se utilizaron para aplicar técnicas de lectin- e inmunohistoquímica, en el laboratorio

de Biología del desarrollo, Instituto de Fisiología, biología molecular y neurociencia (IFIBYNE)-CONICET-UBA.

Lectina-histoquímica

Cortes provenientes de las tres secciones del intestino, de peces control y tratados con la dosis alta de MCLR, se desparafinaron en xilol y se hidrataron en alcoholes de graduación decreciente y en PBS. Luego se incubaron con las siguientes combinaciones de lectinas (n = 2 en las combinaciones 1 y 2 y n = 1 en 3):

1) **Concanavalina A-Fluoresceína (ConA-F) + Ioduro de propidio**: Se incubó con ConA (1:50) durante 1 hora, en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de lavar en PBS, se agregó ioduro de propidio (tinción nuclear) durante 4 minutos, se lavó una vez más en PBS y se montó en glicerol-PBS (50:50).

2) **Aglutinina de germen de trigo (WGA) + ConA**: Se incubó con WGA biotinilada (1:300) por 16 horas, en cámara húmeda en oscuridad y a 4 °C. Luego de lavar en PBS, se agregó estreptavidina-rodamina (1:500) y ConA-F (1:50). Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se lavó en PBS y se montó con glicerol-PBS (50:50).

3) **Aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) + ConA-F succinilada (ConA-succ)**: Se incubó con DBA biotinilada (1:100) hasta el día siguiente (16 horas), en cámara húmeda en oscuridad y a 4 °C. Luego de lavar en PBS, se agregó estreptavidina-rodamina (1:500) y ConA-succ (1:50). Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se lavó en PBS y se montó en solución de glicerol-PBS (50:50).

Las preparaciones se observaron y fotografiaron con microscopio confocal Olympus Fluoview, utilizando el software Fluoview V 5.0. Las imágenes obtenidas fueron analizadas cuali-cuantitativamente por tres 3 observadores, que desconocían el origen de cada imagen, utilizando las siguientes referencias: 0 (no

se observa reacción), 1 (reacción débil), 2 (reacción moderada), 3 (reacción intensa). Este análisis se aplicó en glicocáliz, células caliciformes y enterocitos. Las células caliciformes se clasificaron y contaron de acuerdo a su reacción con cada lectina. La afinidad de las lectinas utilizadas se detalla en la Tabla 1.

LECTINA + FLUORÓCROMO	ORIGEN	GLÚCIDO QUE RECONOCE	EMISIÓN DEL FLUORÓFORO
Con A-F	<i>Canavalina ensiformis</i>	α -D-manosa, α -D-galactosa	520 nm
ConA-F-succ	<i>Canavalina ensiformis</i>	α -D-manosa, α -D-galactosa	520 nm
DBA biotinilada + estreptavidina-rodamina	<i>Dolichos biflorus</i>	α -N-acetil-D-galactosamina	570 nm
WGA biotinilada + estreptavidina-rodamina	<i>Triticum vulgare</i>	β -N-acetil-D-glucosamina, ácido acetil-neuraminico (ácido siálico)	570 nm

Tabla 1. Combinación de lectinas utilizadas.

Immunohistoquímica

Cortes de intestino medio de *O. hatcheri*, control y tratados con MCLR (dosis baja y alta) fueron hidratados en alcoholes de graduación creciente y en PBS y tratados con los anticuerpos primarios que se describen en la tabla 2. Los pasos seguidos para aplicar cada anticuerpo fueron los siguientes:

Anti-ABCG2: En los cortes hidratados, se bloquearon peroxidases endógenas y sitios inespecíficos de unión (descripción detallada en metodología general, sección 10.2). Se incubó con anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Luego de llevar a temperatura ambiente (30 minutos) se lavó en PBS y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-conejo) biotinilado (1:2000) durante 40

minutos. Se lavó con PBS y se agregó estreptavidina-HRP (1:200) durante 45 minutos y se reveló con DAB metodología general, sección 10.2).

Anti-ABCB1: Se realizó el mismo procedimiento descripto arriba. En algunos cortes, además, se realizó desenmascaramiento de antígenos (en buffer citrato, pH 6 durante 15 minutos a ebullición en baño maría).

Anti-ABCC4: Se realizó el mismo procedimiento pero utilizando como anticuerpo secundario (anti-cabra) biotinilado (1:1000).

Anti-ABCC2: Se realizó el mismo procedimiento utilizando como anticuerpo secundario (anti-ratón) biotinilado (1:200). También se realizaron pruebas con desenmascaramiento de antígenos (en buffer citrato, pH 6 durante 15 minutos a ebullición en baño maría).

ANTICUERPO PRIMARIO	ORIGEN	TIPO	EPITOPE QUE RECONOCE	MARCA
Anti-ABCC2 mAb (M2III-6)	ratón	monoclonal	aa 1339-1541 Abcc2 de rata	ENZO - Life Sciences
Anti-ABCC4 ab77184	cabra	policlonal	Secuencia CNGQPSTLTIFETAL de la región C-terminal de ABCC4 humano y rata	ABCAM
Anti-ABCG2 (M-70): sc-25822	conejo	policlonal	aa 301-370 de Abcg2 de rata y ratón	Santa Cruz
Anti-Mdr (H-241): sc-8313	conejo	policlonal	aa 1040-1280 ABCB1 humano	Santa Cruz

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados.

RESULTADOS

Lectina-histoquímica

ConA + Ioduro de propidio: En todos los cortes la lectina ConA marcó positivamente el citoplasma de los enterocitos, con baja intensidad (1). En la zona apical o subapical, se destaca una marca de aspecto granular, con intensidad 2 en la sección anterior y 1-2 en la sección media. En la sección posterior esta marca es más tenue y casi no se diferencia de la del resto de la célula. Esta tendencia de intensidad de reacción a ConA decreciente de anterior a posterior, se observa tanto en los enterocitos control como en los tratados. El glicocálix también presenta una marca de intensidad moderada-alta, a excepción del intestino medio de los individuos tratados, donde la marca fue débil. Las células caliciformes reaccionan mayoritariamente de manera moderada a intensa (2-3) (tablas 3 y 4). En la figura 1 se muestran imágenes de los controles (no se muestran los tratados con MCLR por las escasas diferencias mencionadas en texto).

ESTRUCTURA	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	CONTROL	MCLR	CONTROL	MCLR	CONTROL	MCLR
GLICOCÁLIX	2-3	2	2-3	1	2	2
CALICIFORMES	2	3	3	3	2-3	1-2
ENTEROCITOS						
Apical-Subapical	2-3	2	2	1-2	1-2	1-2
Cuerpo celular	1	1	1	1	1	1

Tabla 3. Análisis cualitativo de la reactividad de la lectina ConA en tres secciones intestinales de *O. hatcheri*; peces control y peces intoxicados con MCLR (5 µg MCLR/ g pez). Referencias: 0 (reacción negativa), 1(reacción débil), 2(reacción moderada), 3 (reacción intensa).

CALICIFORMES		Con A	Sin reacción	Total de células)
ANTERIOR	CONTROL	96%	4%	110
		100%	-	336
	MCLR	100%	-	174
		100%	-	326
MEDIO	CONTROL	94%	6%	179
		100%	-	230
	MCLR	96%	4%	218
		99%	1%	305
POSTERIOR	CONTROL	100%	-	135
		100%	-	330
	MCLR	78%	22%	120
		100%	-	190

Tabla 4. Análisis cuantitativo de células caliciformes. En % se expresa la proporción de células caliciformes que reaccionaron con la lectina ConA y las que no reaccionaron. n = 2 por tratamiento y sección intestinal.

WGA + ConA: Al comparar entre los cortes de peces control y tratados con MCLR, se observan diferencias de reacción frente a la lectina WGA. Los controles de las secciones anterior y media del intestino presentan reacción de intensidad moderada con WGA en glicocáliz, con algunos sectores con colocación de ambas lectinas; mientras que en los individuos tratados con MCLR la marca es intensa con WGA y también presentan sectores con colocación, salvo en el tratado anterior, donde prácticamente todo el glicocáliz muestra una marca intensa correspondiente a WGA. En intestino posterior de individuos control, se observa un glicocáliz distribuido sobre toda la superficie del tejido, con marca intensa de WGA, en algunas zonas combinada con ConA, mientras que en el tratado, no se encuentra una marca continua ni definida, salvo en sectores donde hay acúmulos de secreción marcados intensamente con WGA.

Las células caliciformes son abundantes en todo el intestino y se evidencia colocación de ambas lectinas, con intensidad de reacción entre moderada e intensa. En la sección media, las lectinas colocan sólo en algunas células. En

esta sección, en los cortes control predomina la marca de WGA, con intensidad moderada y células en las que las dos lectinas colocalizan pero con predominancia de WGA. En los tratados con MCLR predominan las células caliciformes que reaccionaron intensamente con ConA y hay abundante colocalización con predominancia de ConA. En la sección posterior, en el control hay algunas células caliciformes que reaccionan intensamente con WGA, algunas que reaccionan con ConA y en muchas se observa colocalización. En los tratados, se observa abundante cantidad de células caliciformes, de las cuales la mayoría reacciona con ConA, otras no reaccionan con ninguna lectina y otras presentan reacción débil a WGA.

En cuanto a los enterocitos, sólo reaccionan con ConA, de manera débil en el cuerpo celular y con intensidad moderada en gránulos apicales-subapicales (tablas 5 y 6; fig. 2).

ESTRUCTURA	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	CONTROL	MCLR	CONTROL	MCLR	CONTROL	MCLR
GLICOCÁLIX	2 (WGA)	3 (WGA)	2(WGA)	3 (WGA)	3 (WGA)	3(WGA)
CALICIFORMES	2 (WGA) 2 (ConA)	2-3(WGA) 2-3(ConA)	2 (WGA) 2 (ConA)	2 (WGA) 2-3 (ConA)	2-3 (WGA) 2 (ConA)	0-1(WGA) 2 (ConA)
ENTEROCITOS Apical-Subapical Cuerpo celular	2 (Con A) 1 (ConA)	2 (Con A) 1 (ConA)	1-2 (Con A) 1 (ConA)	1-2(Con A) 1 (ConA)	1-2 (Con A) 1 (ConA)	1-2 (Con A) 1 (ConA)

Tabla 5. Análisis cualitativo de la reactividad de las lectinas ConA y WGA, en las secciones intestinales de *Odontesthes hatcheri*; peces control y peces intoxicados con MCLR (5 µg MCLR/ g pez). Referencias: 0 (reacción negativa), 1(reacción débil), 2(reacción moderada), 3 (reacción intensa).

CALICIFORMES		Con A	WGA	Colocalización	Sin reacción	Total de células
ANTERIOR	CONTROL	10%	5%	82%	3%	151
	MCLR	29%	0	0	71%	119
		13%	39%	48%	0	142
MEDIO	CONTROL	11%	57%	24%	8%	163
	MCLR	65%	0	35%	0	170
		10%	31%	59%	0	244
POSTERIOR	CONTROL	16%	78% (intensidad 2-3)	6%	0	93
	MCLR	49%	19% (intensidad 1)	0	32%	192

Tabla 6. Análisis cuantitativo de células caliciformes. En % se expresa la proporción de células que reaccionaron con la lectina Con A, con WGA, las que colocalizaron y las que no reaccionaron. $n = 1-2$ por tratamiento y sección intestinal.

DBA + ConA succinilada: Al comparar entre los cortes control y tratados con MCLR, se observan leves diferencias de reacción frente a las lectinas ConA-succ. y DBA. No se pudieron analizar los cortes correspondientes al control de la sección anterior por fallas técnicas. Las secciones media y posterior presentan marca intensa de ConA de forma granular, en la zona apical-subapical de los enterocitos y una marca de intensidad baja, en glicocálix. Esta marca de ConA-succ se vuelve más suave, tanto en citoplasma como en la zona apical de los enterocitos de intestino posterior. En ambas secciones, se ve poca cantidad de células caliciformes, algunas con marca intensa de ConA, otras con DBA, otras con colocalización. Se observan también células caliciformes sin marca, en menor proporción (tablas 7 y 8, fig. 3). En los cortes de peces tratados con MCLR, se observa, en general, un aumento en la cantidad de células caliciformes con colocalización de ambas lectinas y una disminución en las células reactivas a DBA.

ESTRUCTURA	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	CONTROL	MCLR	CONTROL	MCLR	CONTROL	MCLR
GLICOCÁLIX	-	1-2 (ConA)	1-2 (ConA)	1-2 (ConA)	1(ConA)	1(ConA)
CALICIFORMES	-	3(DBA) 3(ConA)	3(DBA) 2-3(ConA)	3(DBA) 3(ConA)	3(DBA) 3(ConA)	3(DBA) 3(ConA)
ENTEROCITOS Apical-Subapical Cuerpo celular	-	3 (Con A) 1 (ConA)	3 (Con A) 1 (ConA)	3 (Con A) 1 (ConA)	2 (Con A) 1 (ConA)	2 (Con A) 1 (ConA)

Tabla 7. Análisis cualitativo de la reactividad de las lectina ConA succinilada y DBA, en las secciones intestinales de *Odontesthes hatcheri*; peces control y peces intoxicados con MCLR (5 µg MCLR / g pez). Referencias: 0 (reacción negativa), 1(reacción débil), 2(reacción moderada), 3 (reacción intensa).

CALICIFORMES		ConA	DBA	Colocalización	Sin reacción	Total (n° de células)
ANTERIOR	CONTROL	-	-	-	-	-
	MCLR	36%	45%	15%	4%	167
MEDIO	CONTROL	36%	33%	20%	12%	101
	MCLR	43%	10%	46%	0	164
POSTERIOR	CONTROL	35%	55%	0	11%	130
	MCLR	35%	55%	10%	0	163

Tabla 8. Análisis cuantitativo de células caliciformes. En % se expresa la proporción de células que reaccionaron con la lectina ConA, con DBA, las que colocalizaron y las que no reaccionaron. n = 1 por tratamiento y sección intestinal.

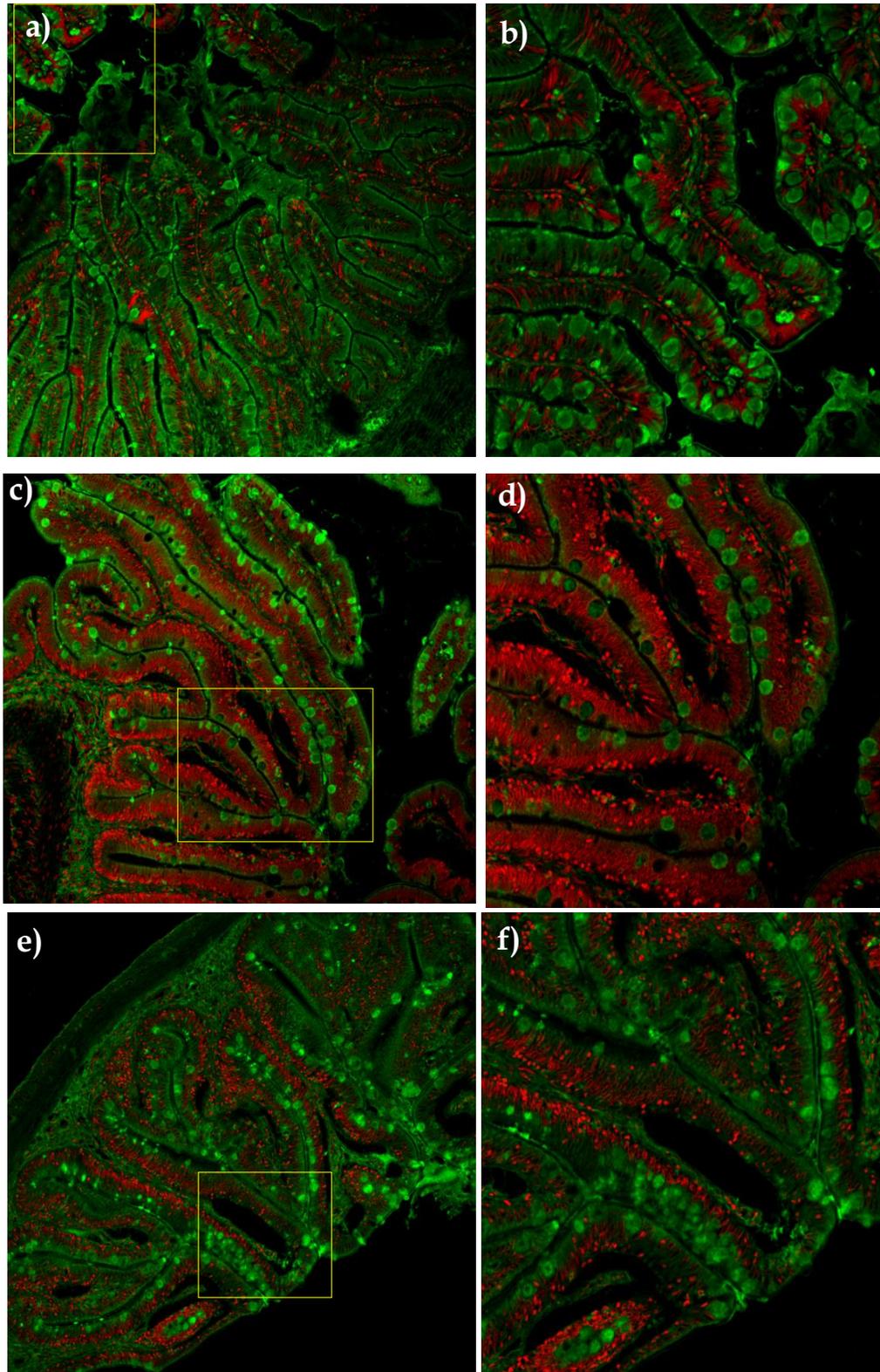


Figura 1. Secciones anterior (a), media (c) y posterior (e) del intestino de *Odontesthes hatcheri* (individuos control). Aumento 200 x. Detalle del recuadro amarillo en aumento 400 x en fotos (b), (d) y (f). Lectina ConA (emisión a 520 nm, marca verde), núcleos marcados con Ioduro de propidio (emisión a 617 nm, marca roja).

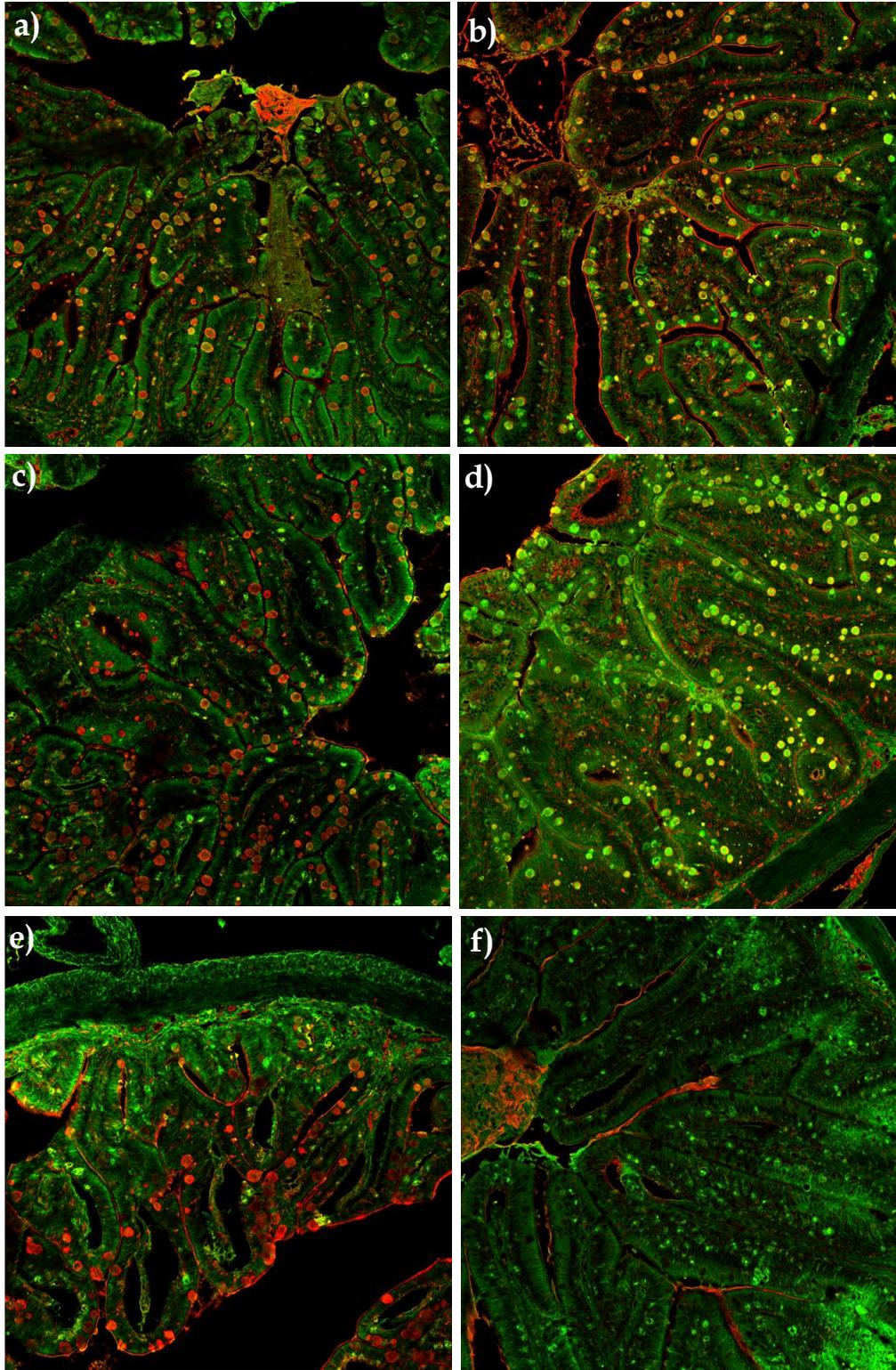


Figura 2. Secciones anterior (a), media (c) y posterior (e) del intestino de *Odontesthes hatcheri* control. Secciones anterior (b), media (d) y posterior (f) de peces intoxicados con MCLR. Aumento 200 x. Lectina ConA (emisión a 520 nm, marca verde), lectina WGA (emisión a 570 nm, marca roja).

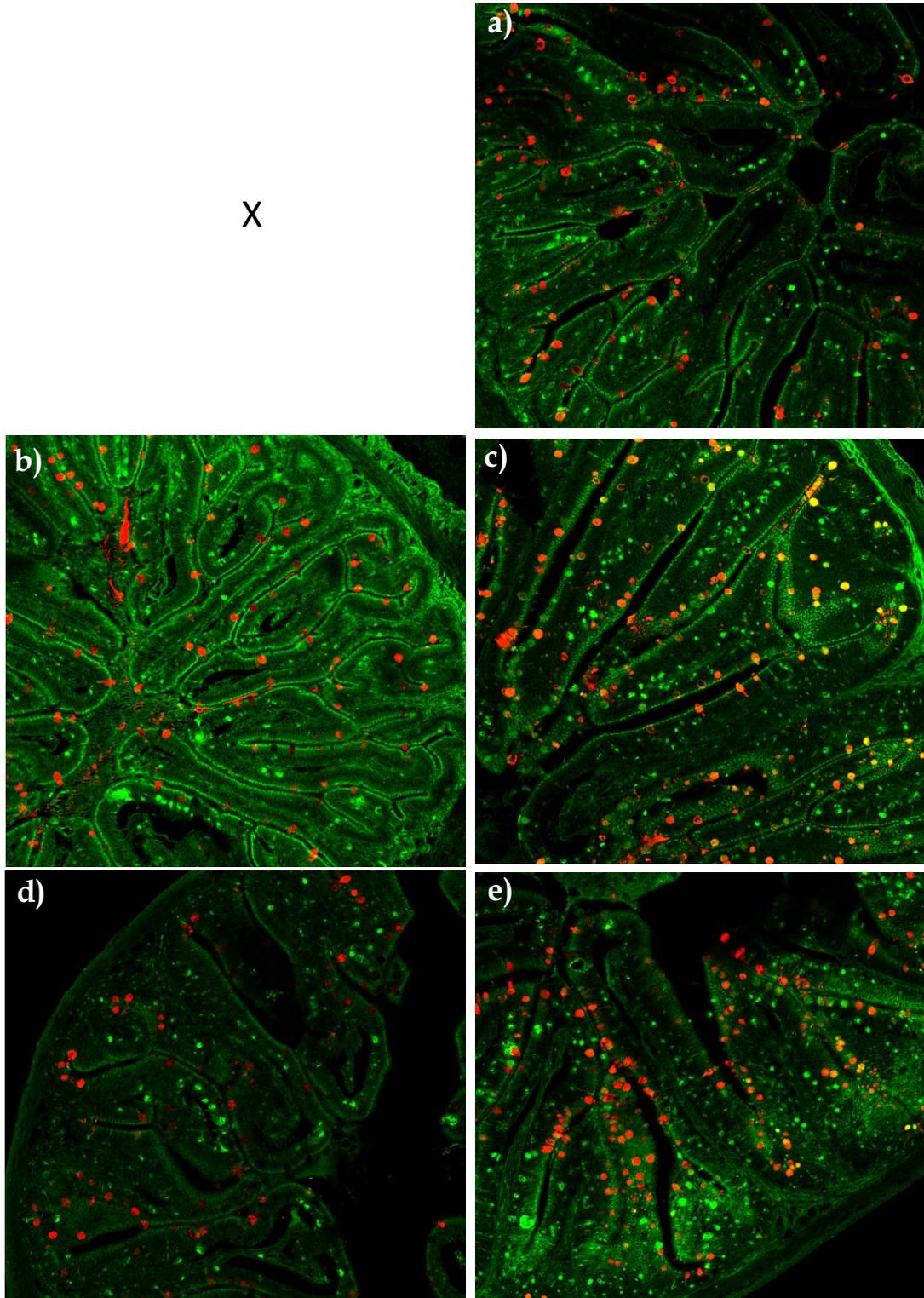
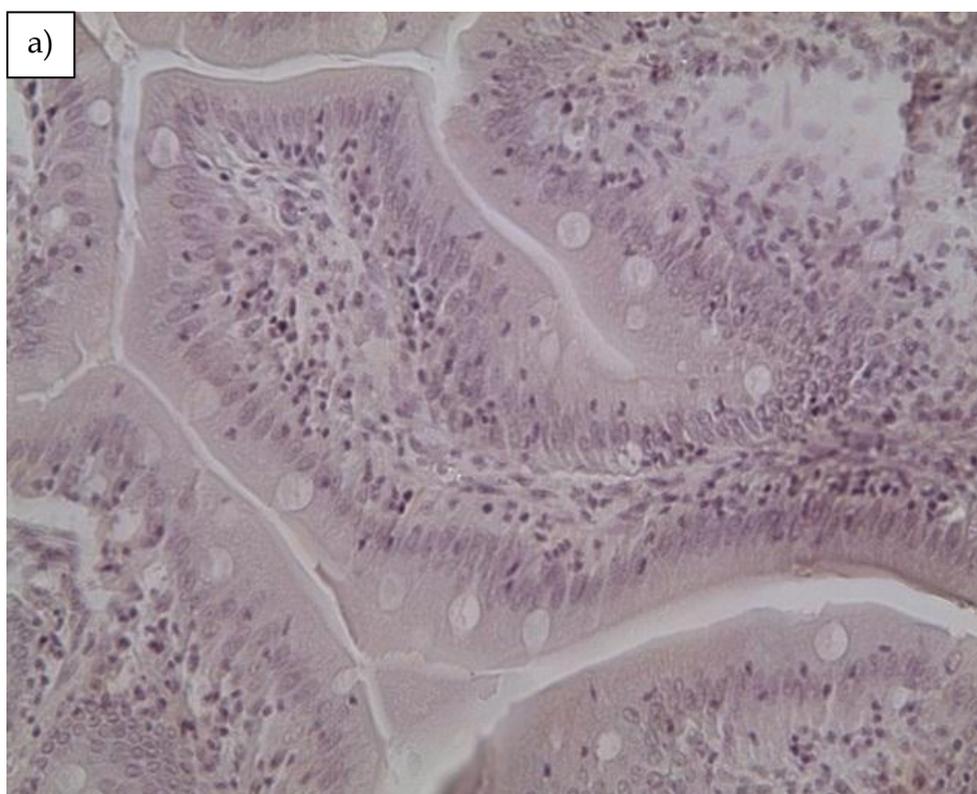
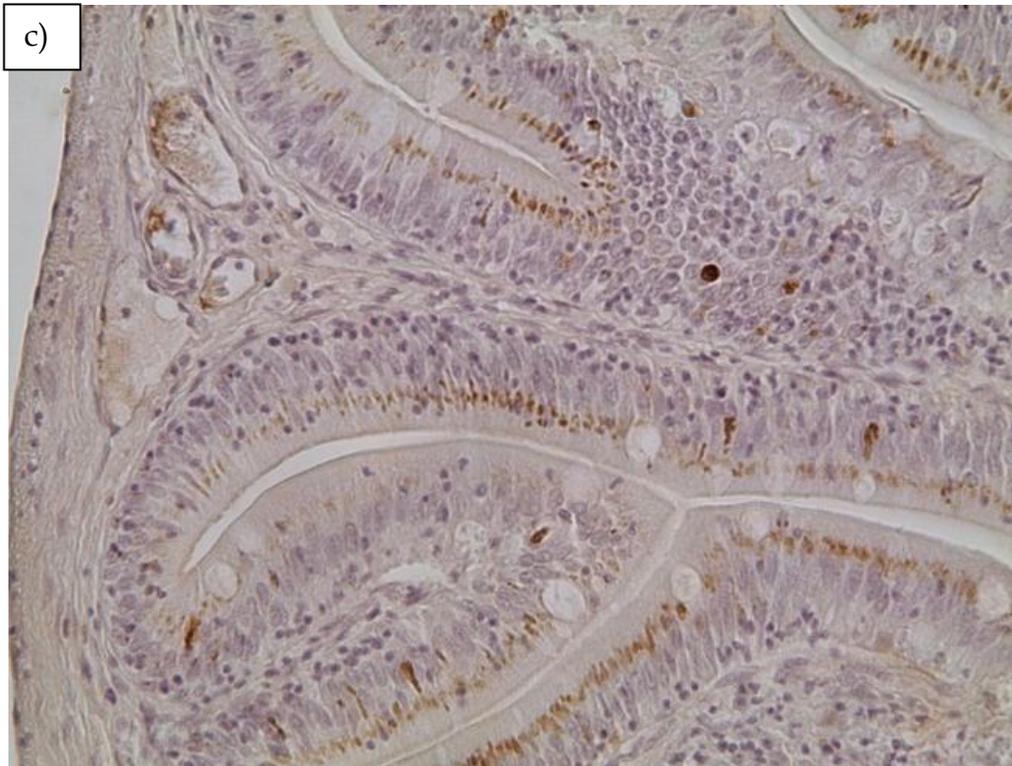
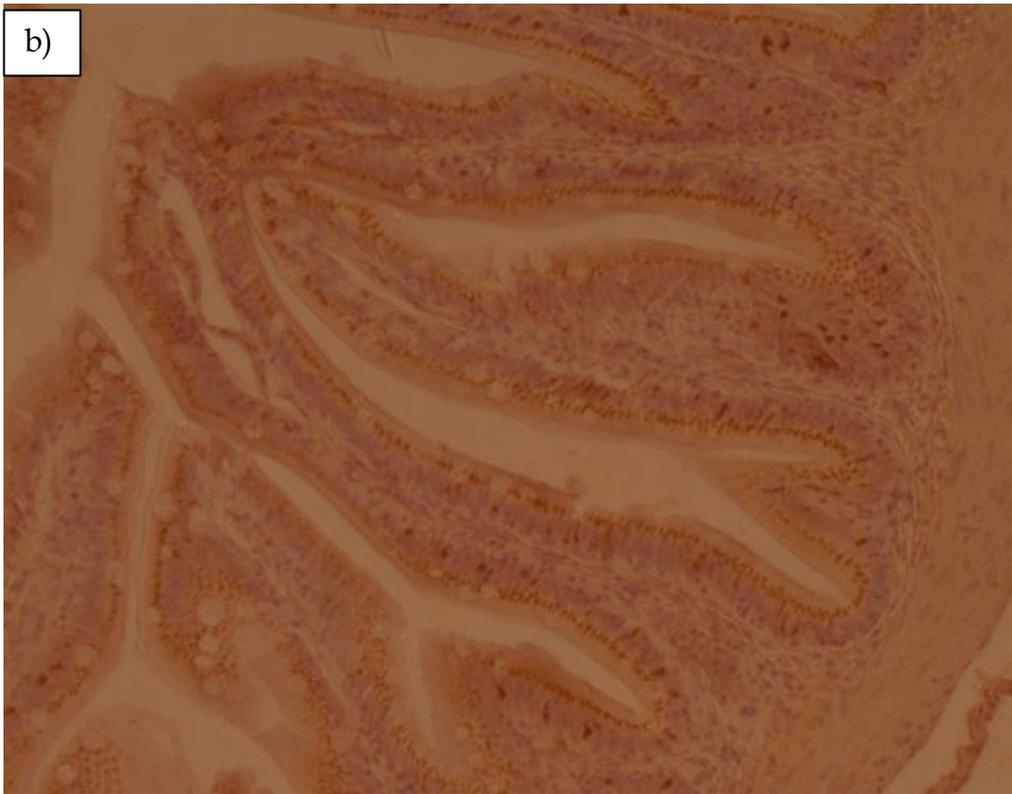


Figura 3. Secciones media (b) y posterior (d) del intestino de *Odontesthes hatcheri* control. Secciones anterior (a), media (c) y posterior (e) de peces intoxicados con MCLR. Aumento 200x. Lectina ConA (emisión a 520 nm, marca verde), lectina DBA (emisión a 570 nm, marca roja).

Inmunohistoquímica

De los anticuerpos utilizados (anti- ABCB1, ABCC2, ABCC4 y ABCG2), sólo reaccionaron positivamente anti-Abcc4 y anti-Abcg2. No se encontraron diferencias de marcación entre cortes de intestino de individuos control e intoxicados con MCLR (dosis baja y dosis alta de MCLR). En los controles negativos (sin anticuerpo primario) no se evidenció ninguna reacción. La marca de Abcg2 fue intensa en la región subapical de los enterocitos, inmediatamente por encima de los núcleos. Mientras que la marca de Abcb4 se ubicó en la membrana basolateral de los enterocitos y fue más visible en la porción proximal de las vellosidades (cercana a la túnica muscular). El anticuerpo contra Abcb4 marcó intensamente las capas de músculo longitudinal y circular del intestino.





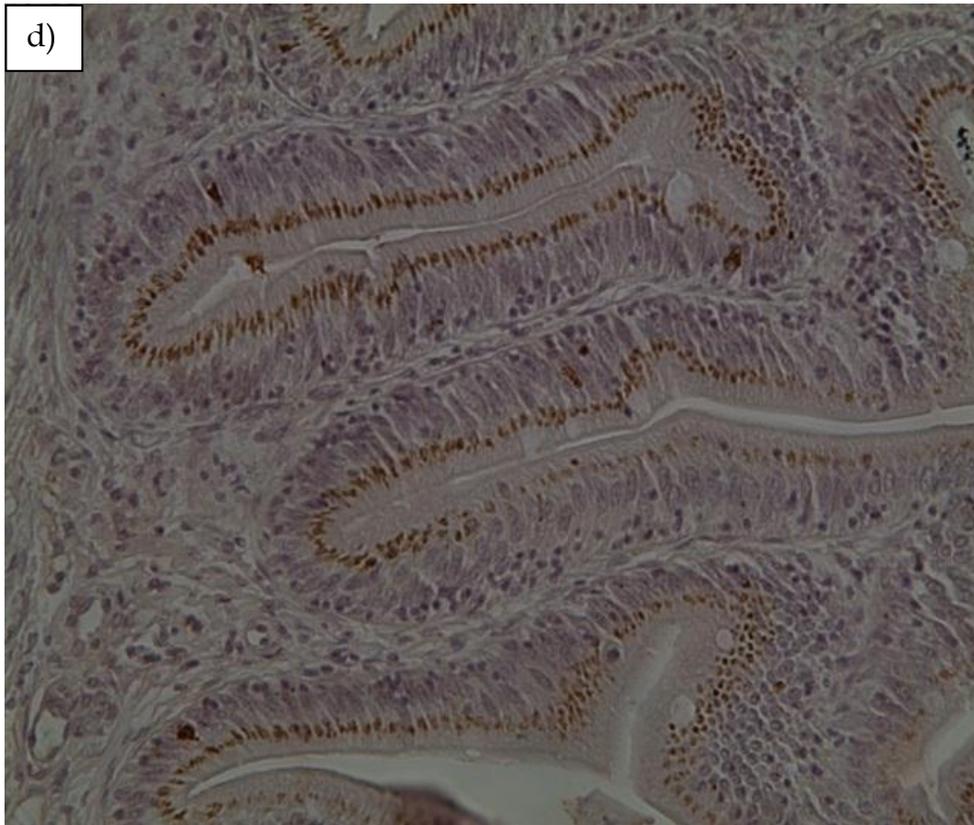
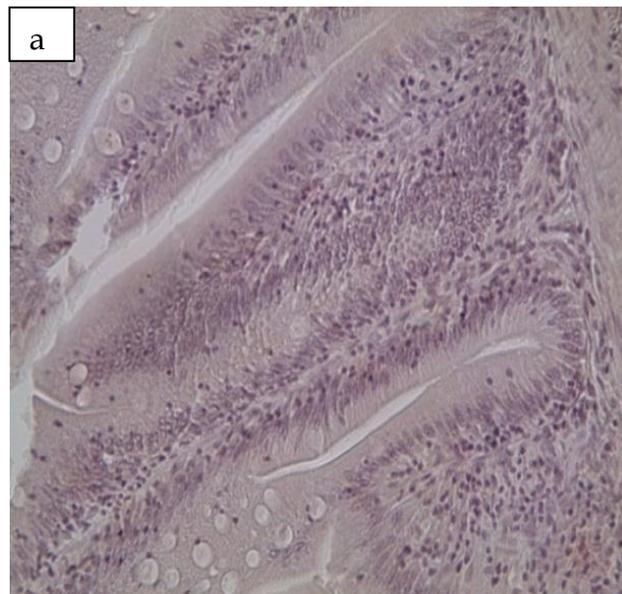
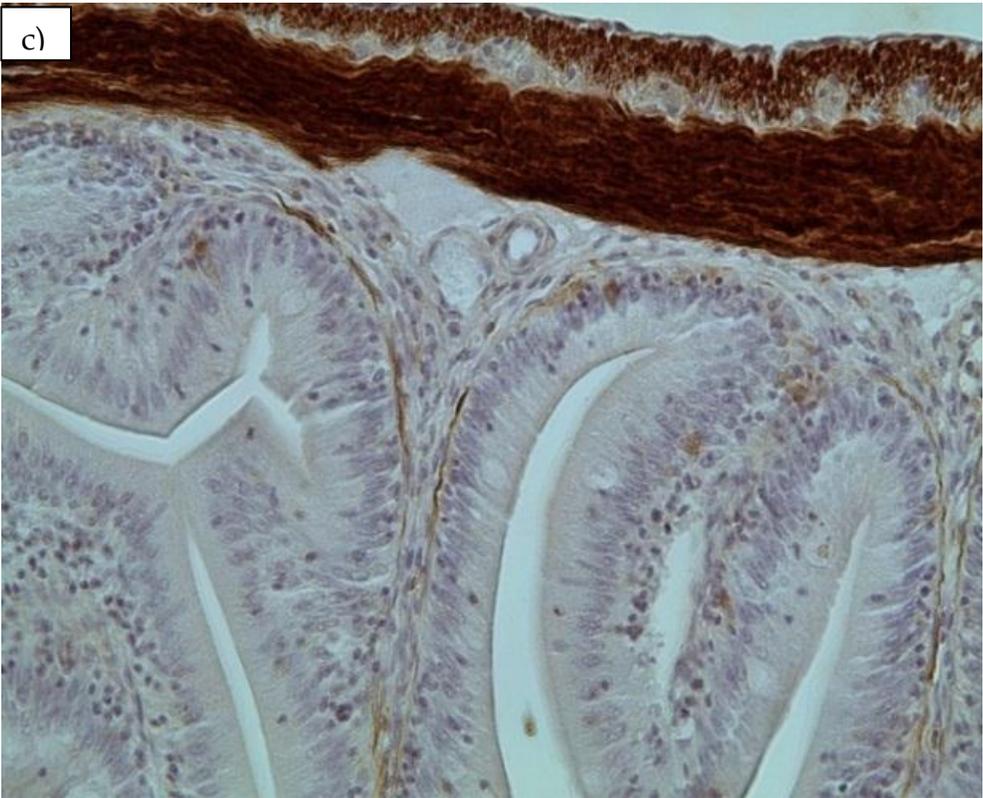
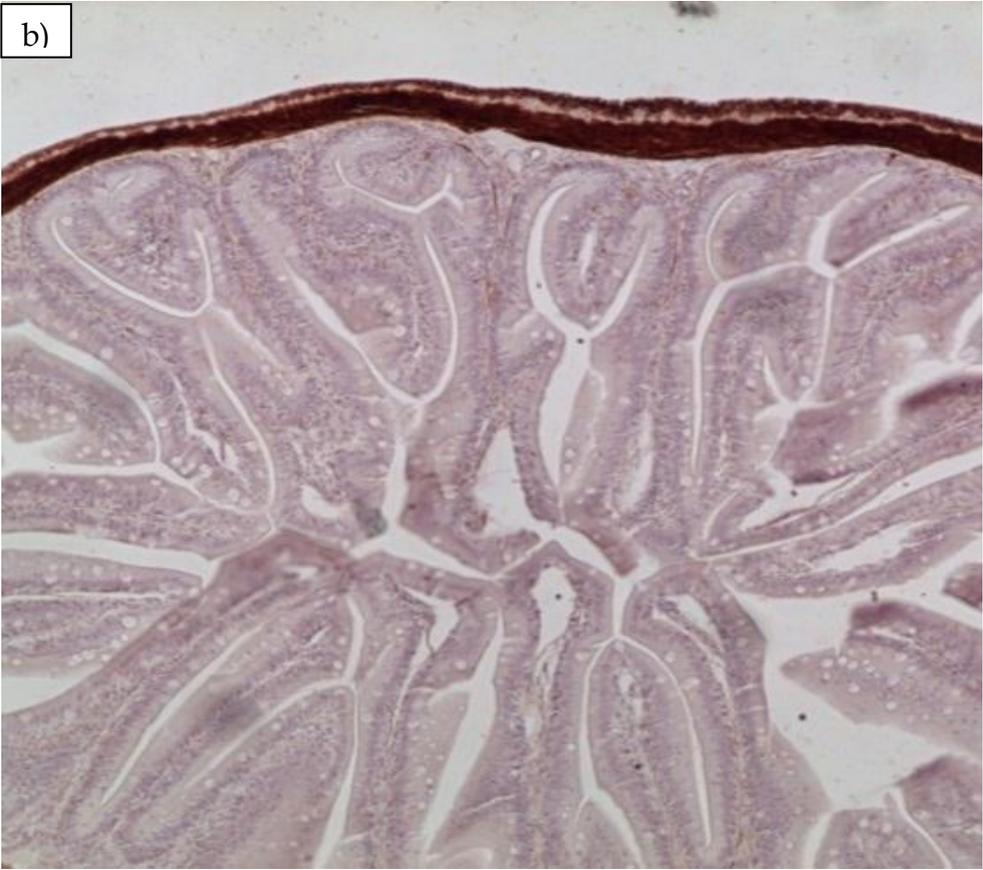
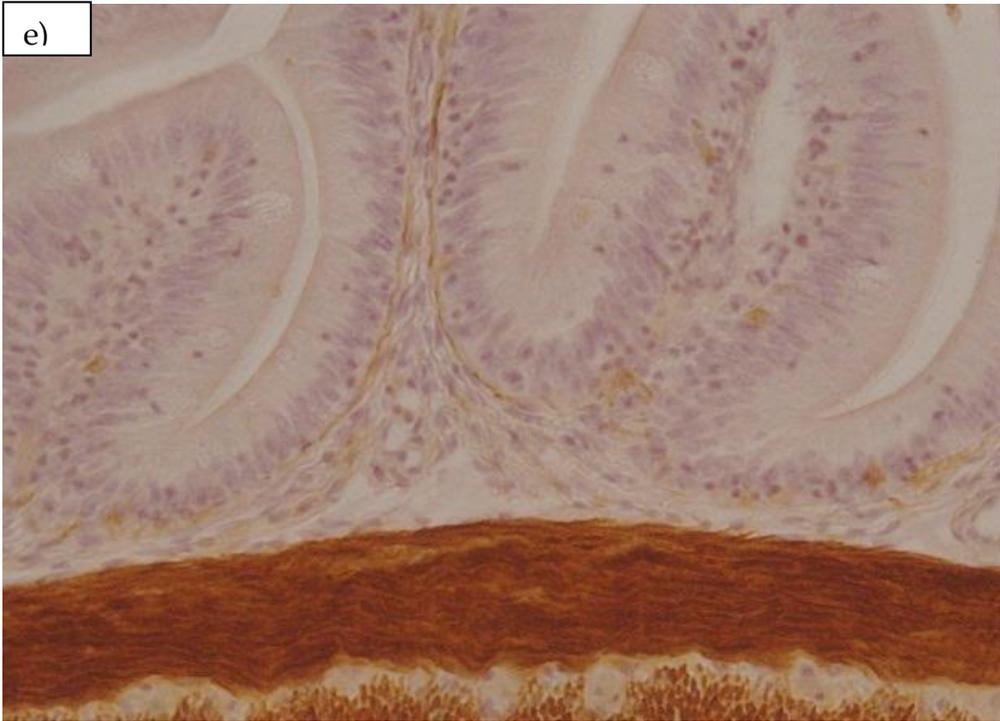
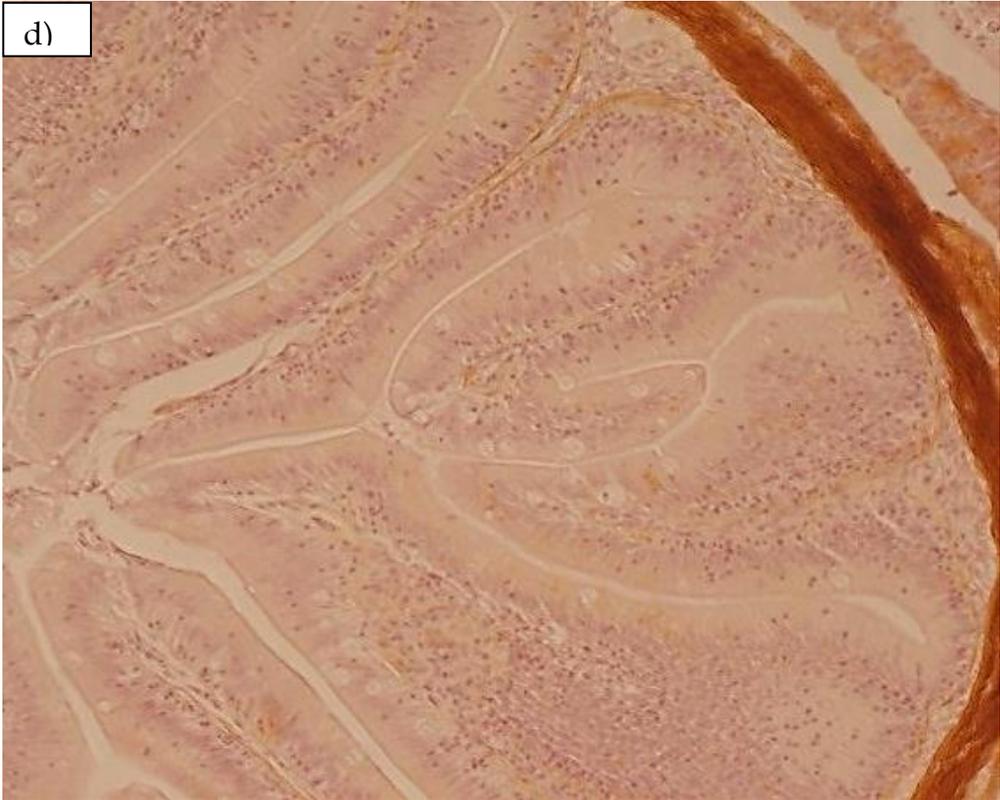


Figura 4. **a)** Control negativo Abcg2, **b)** reacción positiva con anti-Abcg2 en intestino de peces control, **c)** en intestino de peces tratados con $2 \mu\text{g g}^{-1}$ MCLR, y **d)** en intestino de peces tratados con $5 \mu\text{g g}^{-1}$ MCLR. Aumento: 400 x.







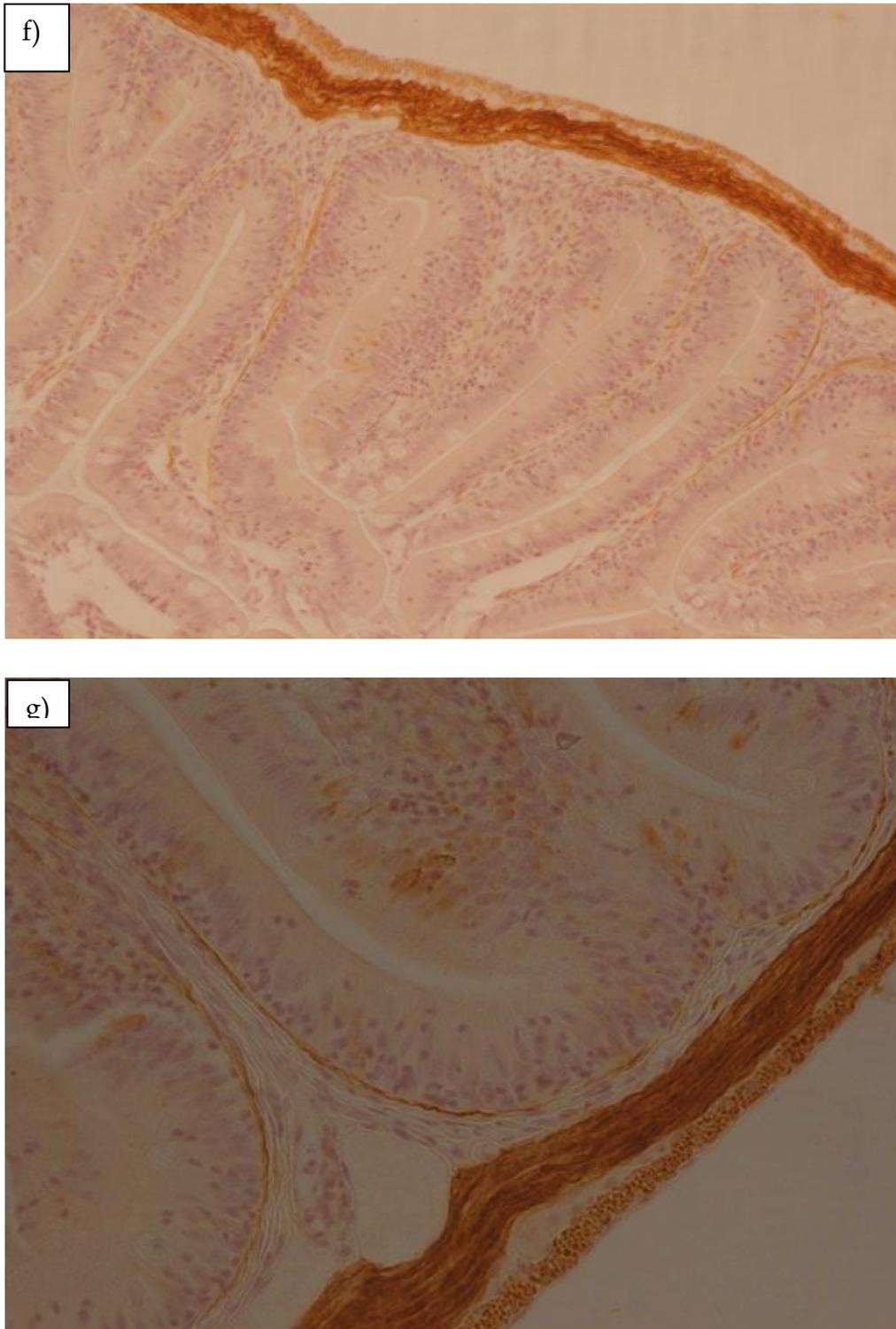


Figura 5. *a)* Control negativo Abcc4, aumento 400 x, *b)* reacción positiva con anti-Abcc4 en intestino de peces control, aumento 200 x, *c)* detalle a 400 x. *d)* Reacción positiva con anti-Abcc4 en intestino de peces tratados con $2 \mu\text{g g}^{-1}$ MCLR, aumento 200 x, *e)* detalle a 400 x. *f)* Reacción positiva con anti-Abcc4 en intestino de peces tratados con $5 \mu\text{g g}^{-1}$ MCLR, aumento 200 x, *g)* detalle a 400 x.

DISCUSIÓN

En los peces, la secreción intestinal de mucus cumple numerosas funciones, que incluyen desde participación en la digestión, excreción y regulación iónica y osmótica a protección frente a enzimas digestivas y agentes patógenos (Dezfuli et al., 2010). La secreción mucosa es variable entre especies, sexo, edad, época del año y condiciones patológicas (Pang et al., 1987; Falk et al., 1994; Chae y Lee, 1995; Zanuzzi et al., 2010), por lo que resulta difícil establecer una composición general del mucus. Los estudios lectinhistoquímicos pueden brindar información, entre otras cosas, sobre la composición de estas secreciones y sobre la presencia de distintos glicoconjugados a lo largo del intestino. En el caso particular de esta tesis, el uso de lectinas reveló efectos de MCLR sobre la composición de las secreciones y sobre la presencia de distintos glicoconjugados, en distintas secciones del intestino de *O. hatcheri*, según lo esperado (P1).

La reacción positiva a la lectina ConA indica la presencia de α -D-manosa y/o α -D-galactosa a lo largo de todo el intestino, sobre todo en células caliciformes, en el glicocálix y en la zona apical de los enterocitos. En muchas de las preparaciones obtenidas, la marca apical aparece con un aspecto granular, probablemente debido a las microvellosidades, lo que no permite discernir claramente si se trata de una marca de membrana y/o de acúmulos subapicales. Al comparar la intensidad de reacción con esta lectina en enterocitos, a lo largo del intestino, en todos los casos se observa una disminución de intensidad desde la sección anterior hacia la posterior, indicando que la presencia de estos compuestos es más abundante al comienzo del intestino. Por el contrario, las células caliciformes presentaron una marca intensa de ConA, uniforme a lo largo del intestino. La presencia de residuos de manosa tendría un papel protector contra infecciones bacterianas (Lemaitre et al., 1996; Burkhardt-Holm, 1997; Díaz et al., 2005). La variante succinilada de ConA marcó las mismas zonas que ConA pero parece tener más especificidad de reacción. Por ejemplo, en los enterocitos,

especialmente en la sección posterior, ConA-succ muestra una marca delgada y nítida de membrana mientras que la marca de ConA forma una banda más ancha y de aspecto granular, de membrana apical hacia la zona subapical.

La lectina WGA reconoce específicamente β -N-acetil-D-glucosamina y ácido siálico. En las preparaciones hechas con la combinación WGA-ConA, se observa un efecto de MCLR sobre el patrón de secreción de las células caliciformes, particularmente en la sección media del intestino. En el control se observa predominancia de células secretoras de azúcares reactivos a WGA, mientras que en los tratados predominan las células caliciformes reactivas a ConA. En este caso particular, se podría suponer que el tratamiento con MCLR, aumenta la producción de monosacáridos defensivos como α -D-manosa. Además, en los tratados, la marca de WGA aparece más intensamente en glicocáliz al tiempo que disminuyen el número de células caliciformes con dicha marca, aunque aumenta el porcentaje de células caliciformes en las que colocan ambas lectinas. Estos resultados sugieren que aumenta la liberación del contenido de las células caliciformes WGA-positivas frente a la exposición a MCLR. La β -N-acetil-D-glucosamina es un monosacárido con un grupo amino como parte de su estructura. Este compuesto es nutriente, metabolito intermediario y componente del glicocáliz, y está presente en todas las células del cuerpo. En el intestino delgado de mamíferos, protege al epitelio de las enzimas de la digestión y otros peligros potenciales del contenido intestinal (Pavlova et al., 2013). El aumento de la presencia de este compuesto en el glicocáliz del intestino medio de *O. hatcheri* podría reflejar la activación de un mecanismo de defensa contra MCLR. El ácido siálico, otro compuesto afín a la lectina WGA, se ha descrito en numerosas especies de peces a través de métodos histoquímicos y análisis químicos (Díaz et al., 2008, 2010). Las glicoproteínas ácidas del tipo sialiladas reducen la viscosidad del mucus (Domeneghini et al., 1999; Meyer et al., 2009).

En la sección posterior, parece que el tratamiento con MCLR disminuye la producción de β -N-acetil-D-glucosamina y/o ácido siálico en las células

caliciformes, debido a que la reacción frente a WGA es débil o nula, no hay colocalización de ConA y WGA y aumenta sensiblemente el porcentaje de células sin marca, con respecto al control. Por otro lado, el aumento de las células caliciformes ConA positivas podría reflejar una respuesta defensiva a través de la secreción de α -D-manosa, como en el intestino medio.

La lectina DBA, que indica la presencia de α -N-acetil-D-galactosamina, reaccionó sólo en células caliciformes. En los cortes de peces intoxicados con MCLR, se observa un aumento en la cantidad de células donde colocalizan DBA y ConA respecto de los controles. Esto sugiere que algunas de estas células liberarían combinación de α -D-manosa/ α -D-galactosa (reacción con ConA) y α -N-acetil-D-galactosamina (reacción con DBA), frente a intoxicación con MCLR; mientras que en los controles las secreciones aparecen en células separadas. El glicoconjugado α -N-acetil-D-galactosamina (reacción DBA), se relaciona con funciones de lubricación, protección y transporte de moléculas, al igual q otros glicoconjugados (Díaz et al., 2012).

De acuerdo a la bibliografía revisada para esta tesis, no hay estudios previos de lectina-histoquímica en *O. hatcheri*, ni estudios sobre los efectos de MCLR sobre la composición de glicoconjugados en intestino de peces ni de otros grupos. Díaz et al. (2012) estudiaron los glicoconjugados de la mucosa de la cavidad faríngea y del esófago de *O. bonariensis*, utilizando lectinas. En dicho trabajo se observa reacción positiva a DBA, entre otras lectinas aplicadas, indicando la presencia, aunque escasa, de α -N-acetil-D-galactosamina, sobre todo en glicocálix y en células epiteliales. También encuentran reacción positiva a ConA en la superficie de las células de faringe y esófago y WGA en células mucosas, epiteliales y en el glicocálix de ambos órganos. En otro trabajo que estudia la composición de glicoconjugados a lo largo del intestino de individuos de *O. bonariensis* colectados en distintos embalses de la Argentina, se describe una reacción intensa a DBA en células caliciformes de la sección media del intestino y menor reacción en las

secciones anterior y posterior (Castagnino, 2005). En contraste, los resultados obtenidos en este capítulo con *O. hatcheri* no ponen en evidencia diferencias en cuanto a la reacción de DBA en caliciformes a lo largo del intestino. Castagnino (2005) también observa que en la sección media del intestino predomina la reacción frente a ConA, aunque no en células caliciformes, a diferencia de *O. hatcheri* (esta tesis), donde en todas las secciones, las células caliciformes reaccionan de manera moderada-intensa con ConA, aunque los dos trabajos coinciden en que los enterocitos son ConA-positivos.

En *O. bonariensis* Castagnino (2005) concluye que en la sección anterior hay más galactosa/N-acetilgalactosamina (DBA), en intestino medio predominan glicoconjugados con residuos de manosa/glucosa (ConA) y N-acetilglucosamina (WGA), y en posterior predomina N-acetilglucosamina (WGA). En *O. hatcheri*, se observa un patrón distinto. DBA reaccionó intensamente a lo largo de todo el intestino, sin ser evidentes diferencias entre secciones. ConA, presentó reacción más intensa en enterocitos de la sección anterior y media, aunque en células caliciformes la marca fue intensa en las tres secciones. En cuanto a WGA, al igual que en *O. bonariensis*, la reacción de esta lectina en la sección posterior de intestino fue intensa, tanto en glicocálix como en células caliciformes en comparación con las secciones anterior y media.

En cuanto a los resultados de inmunomarcación de transportadores ABC, son pocos los antecedentes en intestino de peces y no existe información sobre *O. hatcheri* ni sobre *O. bonariensis*. Lamentablemente, no fue posible marcar Abcc2 y relacionar su ubicación en membrana con el transporte de MCLR detectado funcionalmente en el capítulo 2. Se sabe que los anticuerpos comerciales disponibles para transportadores ABC de mamíferos funcionan en muy pocos casos para identificar proteínas de peces (Luckenbach et al., 2014). En particular, se utilizaron anticuerpos específicos contra Abcc2 y Abcb1 de mamíferos, no pudieron lograrse resultados positivos por inmunohistoquímica ni por Western

blott (anexo II, pág. 197). Los transportadores detectados exitosamente, Abcg2 y Abcc4, no presentan cambios en cuanto a su ubicación en la célula o intensidad de marca frente a la intoxicación con MCLR (a diferencia de lo esperado, P2a, b). Ninguno de ellos ha sido relacionado hasta ahora con el transporte de esta toxina y no se puede descartar que al ser anticuerpos contra proteínas de mamíferos, tengan reacción cruzada con más de una proteína ABC en peces (Luckenbach et al., 2014). Sin embargo, la localización de la marca para ambas proteínas detectadas coincide con lo esperado según los antecedentes en mamíferos. Además, el análisis de alineamiento de las secuencias de aminoácidos reconocidas por los anticuerpos utilizados con las secuencias de proteínas ortólogas en diferentes especies de peces (ANEXO III, pág. 198) y con secuencias de otras proteínas ABC de peces, sugieren que las marcas obtenidas serían específicas para Abcg2 y Abcc4 de *O. hatcheri*.

Como ya se mencionó en la introducción, la ubicación de ABCC4 es poco clara en intestino de mamíferos. Existen antecedentes de localización basolateral (Ming y Thakker, 2010; de Waart et al., 2012), apical (Oostendorp et al., 2009) y en ambas membranas (Li et al., 2007). En intestino de peces, este transportador sólo ha sido detectado mediante expresión génica (Lončar et al., 2010; Zaja et al., 2011) y se desconoce su localización. Los resultados de este trabajo indican que Abcc4 se ubicaría en la membrana basolateral de los enterocitos y, particularmente, en la región proximal de las vellosidades, es decir en la región más cercana a los vasos sanguíneos. Por otro lado, las capas musculares de la pared intestinal reaccionaron de manera muy intensa con el anticuerpo anti-Abcc4. Hasta el momento, no se ha descrito que este transportador esté en abundancia en tejido muscular aunque si se ha descrito su presencia en músculo liso vascular de mamíferos (Russel et al., 2008; Klaassen y Aleksunes, 2010) donde podría tener un papel modulador al controlar la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc). Lo mismo podría ser inferido para el musculo liso intestinal de *O. hatcheri*. Se conoce que el AMPc es un segundo mensajero celular, que se encuentra implicado en la

regulación de una gran variedad de funciones, incluyendo la contracción muscular, y que el GMPc también es un mensajero celular que participa en vías de señalización, que llevan a la relajación del músculo liso (Carvajal et al., 2000).

La participación de ABCC4 en la defensa frente a xenobióticos es poco clara, ya que mayormente se ha visto que transporta sustratos relacionados con el metabolismo y señalización celular (como AMPc, GMPc, prostaglandina E, estradiol, ácidos biliares) (revisiones de Chan et al., 2004; Klaassen y Aleksunes, 2010), aunque a medida que se incrementan los trabajos sobre este transportador (junto con los estudios sobre Abcc5), ambos tipos de transportadores se relacionan cada vez más con un papel protector frente a xenobióticos (Borst et al., 2007; Russel et al., 2008). Debido a que en este capítulo se encontró una proteína tipo Abcc4 basolateral, es posible considerar que participe en el flujo hacia el lado serosal de MCLR. Aunque no se menciona a DNP-SG ni a calceína como sustratos de este transportador (Borst et al., 2007; Klaassen y Aleksunes, 2010), sí se ha informado que transporta varios sustratos de Abcc2, como metotrexato, estradiol 17 β glucurónido, entre otros (Borst et al., 2007; Klaassen y Aleksunes, 2010) y que es sensible a MK571 (Russel et al., 2008).

En cuanto a ABCG2, en mamíferos, mediante inmunohistoquímica se observó marcación prominente de este transportador en la membrana apical del intestino delgado y colon, así como también en la membrana canalicular de hepatocitos (Chan et al., 2004). La ubicación subapical en los enterocitos obtenida en este capítulo, podría indicar que este transportador se encuentra inserto en vesículas intracelulares cercanas al aparato de Golgi, que, frente a un estímulo adecuado, se insertarían en membrana. En este trabajo, MCLR no provocó que esta localización subapical se alterara. Notablemente, no se observa ninguna marca en membrana apical, lo que sugiere que, en el intestino de *O. hatcheri*, este transportador solo es funcional cuando su translocación a membrana es estimulada.

CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES

CONSIDERACIONES FINALES

Las cianotoxinas son un problema ambiental en diversas partes del mundo. El riesgo que implican para la salud humana y para el ambiente hace que los estudios sobre toxicidad y bioacumulación de estas toxinas sean de gran relevancia, sobre todo en organismos acuáticos, que viven en ambientes donde en general existen cianobacterias y sus metabolitos tóxicos. Dentro de la biota acuática, comprender la relación de los peces con las cianotoxinas es fundamental debido a que las mortandades en poblaciones naturales de peces y en establecimientos de acuicultura, causadas por cianotoxinas pueden acarrear grandes pérdidas económicas, sumadas al riesgo para la salud que implica consumir alimento con estas toxinas.

En esta tesis, se tomó como modelo principal a una especie de importancia regional, el pejerrey patagónico, *Odontesthes hatcheri*, para estudiar varios aspectos de la toxicocinética de la cianotoxina MCLR en peces omnívoros. En el capítulo II se abordó un tema muy poco tratado hasta ahora en toxicología y fisiología de peces, como el transporte celular de toxinas en epitelio intestinal, especialmente a través de proteínas ABC. Se hizo foco en el intestino debido a que este órgano es el primer paso en la absorción/eliminación de compuestos tóxicos y, paradójicamente, es uno de los órganos en los que estas funciones han sido menos estudiadas en peces. Para el desarrollo de este tema, se incorporó una segunda especie, que es un modelo muy importante para estudios de biología de peces en todo el mundo y que, además, es un recurso muy importante en la región patagónica, la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*.

Toxicocinética de MCLR en *Odontesthes hatcheri*

O. hatcheri habita ambientes, donde las cianobacterias son importantes componentes del plancton y donde eventualmente ocurren floraciones tóxicas

(Puig, 1992; Wenzel y Díaz, 2008; Echenique y Aguilera, 2009; Othaz Brida et al., 2010). Más aún, las cianobacterias son frecuentes en el contenido digestivo en esta especie (Vila y Soto, 1981; Ferrada, 2010; Hualde et al., 2011). En el primer capítulo de esta tesis, a través de la intoxicación *in vivo* con células de *M. aeruginosa*, se pudo confirmar que *O. hatcheri* es capaz de digerir células de cianobacterias y de absorber la toxina liberada en el tracto digestivo. Esto indica que, aún en ausencia de floraciones visibles, *O. hatcheri* podría estar expuesto a cianotoxinas.

En el capítulo I se observa que la mayor cantidad de MCLR acumulada en *O. hatcheri* representa aproximadamente el 34% del total de la toxina administrada. Este valor se registra a las 3 horas post-intoxicación y comprende lo acumulado en intestino (32%) e hígado (2%). Esto sugiere que el intestino es una importante barrera para la entrada de la toxina. Se conoce que MCLR ingresa a las células por transportadores Oatp (Fischer et al., 2005; Boaru et al., 2006) y en el interior de la célula es conjugada con GSH (Pflugmacher et al., 1998), facilitando de esta forma su posterior eliminación. La proporción limitada de MCLR detectada en *O. hatcheri*, podría relacionarse con la capacidad de absorción de MCLR (por ejemplo, la afinidad de los transportadores Oatp), o con la participación de transportadores de defensa, que eliminen la toxina absorbida nuevamente hacia el lumen intestinal, sin permitir que la misma se acumule en su totalidad en intestino ni llegue a otros tejidos. En este trabajo no se pudo estudiar la absorción de MCLR por Oatp, por lo que sólo se analiza la función de transportadores que exportan de la célula la MCLR absorbida.

Aunque existen trabajos que relacionaron la eliminación de MCLR con la actividad de la proteína Abcb1 (Contardo-Jara et al., 2008; Amé et al. 2009), los antecedentes de transporte de MCLR son escasos. Considerando la afinidad de los transportadores Abcc por sustratos conjugados con GSH y el hecho de que este tipo de transportadores se encuentran en gran proporción en los tejidos de peces, incluyendo al intestino de *O. mykiss* (Zaja et al., 2008; Fischer et al., 2011; Ferreira et

al., 2014a; Luckenbach et al., 2014), en esta tesis se propone que proteínas Abcc participan en el transporte celular de MCLR. En el capítulo 2, se detectó inhibición concentración-dependiente del transporte de los sustratos de Abcc, DNP-SG y calceína por MCLR, en preparaciones *ex vivo* de intestino de *O. hatcheri* y *O. mykiss*. Esto sugiere que, en los enterocitos de ambas especies, MCLR es metabolizada por conjugación con GSH, seguida por la excreción hacia el lumen del intestino, a través de transportadores tipo Abcc de ubicación apical. A su vez, parte de la toxina metabolizada es transportada hacia el lado serosal a través de proteínas tipo Abcc basolaterales. Este es el primer trabajo que estudia la relación de transportadores Abcc en la detoxificación de MCLR y el primero en describir una posible vía de transporte de esta toxina desde los enterocitos hacia la sangre.

Según los antecedentes de numerosos trabajos, en los experimentos del capítulo I, se esperaba encontrar MCLR acumulada de distintas formas en los tejidos de *O. hatcheri*: unida a proteínas o extraíble en metanol (nativa o conjugada con GSH o cisteína). De los resultados obtenidos se observa que la mayor proporción de MCLR se encuentra unida a proteínas, tanto en intestino como en hígado. Incluso, parte de la MCLR que alcanza el hígado proveniente del intestino, corresponde a esta fracción unida a proteínas. Se podría interpretar que la MCLR que se absorbe en el intestino se combina covalentemente con proteínas, que luego son degradadas hasta fragmentos más pequeños. Analizando la acumulación de MCLR en *O. hatcheri* a lo largo del tiempo, se observa transferencia de MCLR desde el intestino hacia el hígado (a las 6 horas, la MCLR acumulada en intestino disminuye a la quinta parte mientras que en el hígado aumenta cinco veces). Por otro lado, de 3 a 6 horas se observa que la toxina acumulada entre los dos órganos disminuye a la mitad, es decir, aunque parte de la MCLR acumulada en intestino alcanza otros órganos como el hígado y probablemente riñón, sangre y músculo, otra fracción importante parece ser eliminada hacia el lumen intestinal. Posteriormente, la MCLR acumulada en intestino e hígado disminuye hasta niveles

que resultan indetectables, a las 48 horas. Se podría proponer que en *O. hatcheri* ocurre algo similar a lo descrito por He et al. (2012), Zhang et al. (2012) y Li et al. (2014) quienes describen que, en peces, la mayoría de la MCLR acumulada en los tejidos se encuentra como conjugado de cisteína. Estos autores relacionan este metabolito con la degradación de PP-MCLR. Sin embargo, en *O. hatcheri*, es relativamente baja la proporción de MCLR detectada en la fracción extraíble en metanol (la que incluye a MCLR-Cis). Además, la mayor parte de esta fracción no pudo ser detectada por el ensayo de inhibición de PP1 (mientras que, según Ito et al. 2002, MCLR-Cis es casi tan inhibitoria de la actividad de PP como MCLR), por lo tanto, se podría pensar que la fracción extraíble en metanol detectada en intestino e hígado de *O. hatcheri* estaba compuesta mayoritariamente por otros metabolitos de la degradación de proteínas, que tienen baja capacidad de inhibir la actividad PP. De ser así, surgen interrogantes como qué tipos de metabolitos de degradación de proteínas unidas a MCLR se forman y cómo son transportados hacia afuera del organismo y/o transferidos a otros tejidos.

A pesar de acumular MCLR, *O. hatcheri* no presenta efectos tóxicos notorios. Sólo el hígado responde a la toxina, con aumento de actividad de la enzima GST (tanto por MCLR como por otros componentes de las células de cianobacterias), aumento de la actividad de CAT, sobre todo en las primeras horas post-intoxicación y coincidiendo con daño a lípidos, el cual se compensa a lo largo del tiempo, mientras que CAT vuelve a valores control. GST y CAT son parte de las defensas frente al estrés oxidativo y el hecho de que el hígado sea el único órgano que presentó efectos, indica que, al igual que lo descrito en numerosos trabajos, es uno de los órganos blanco de la toxina en *O. hatcheri*. Por otro lado, los efectos reversibles de daño a lípidos sugieren que las defensas celulares de *O. hatcheri* no son sobrepasadas por la concentración de MCLR.

Lo más interesante en cuanto a la toxicidad, es no haber detectado inhibición de PP1 en ningún momento, en ninguno de los órganos estudiados,

considerando que mayoritariamente se detecta MCLR unida a proteínas. De acuerdo a la literatura, MCLR inhibe a las proteínas fosfatasa PP1 y PP2A, al principio por interacción reversible y luego en forma irreversible por unión covalente. Podría especularse que, en *O. hatcheri*, la toxina se une a otras proteínas (no PP), o que el recambio de estas enzimas en los tejidos estudiados es tan elevado que el efecto inhibitorio queda enmascarado pero esto último es menos probable.

En particular, en intestino, donde se acumula la mayor cantidad de MCLR a las tres horas de la intoxicación *in vivo*, no se detecta estrés oxidativo ni inhibición de PP. Esto coincide con los resultados del capítulo II, donde en preparaciones *ex vivo* de intestino, no se detecta inhibición de PP1 o PP2A ni ningún otro efecto tóxico, aún a concentraciones más altas que las utilizadas en el capítulo 1. Las diferencias entre especies en este aspecto son notables. En preparaciones de intestino de *O. mykiss*, 2,3 μM MCLR produce inhibición de PP1 y PP2A. Un efecto similar se observa con 1,14 μM MCLR, combinado con el inhibidor de Abcc. En cambio, *O. hatcheri* no sufre efectos tóxicos ni siquiera a concentraciones tres veces mayores (6,8 μM MCLR).

El hecho de que MCLR inhibiera el transporte de sustratos específicos de proteínas Abcc en forma concentración-dependiente, tanto en *O. hatcheri* como en *O. mykiss* sugiere que dichos transportadores participan en la eliminación de la toxina, limitando su acumulación y efectos tóxicos. En *O. mykiss*, el aumento en la sensibilidad de la actividad de PP1 y PP2A a MCLR, cuando se inhibe el transporte por Abcc con MK571 refuerza la hipótesis sobre el transporte de MCLR por Abcc. En *O. hatcheri*, la falta de efecto visible de la inhibición de Abcc por MK571, no permite reforzar esa hipótesis. Como se propuso más arriba, en esta especie, una parte importante de la MCLR que ingresa a los enterocitos, se une a proteínas, que no serían en su mayoría PP, ya que en ninguno de los experimentos se detectó su inhibición. El posterior metabolismo de estas proteínas unidas a MCLR y su

transporte hacia el lumen intestinal y/o hacia la sangre, el hígado y posiblemente el riñón, es un proceso más incierto y que excede los límites de los experimentos realizados en esta tesis. Sin embargo, se podría especular que las proteínas unidas a MCLR podrían ser degradadas en intestino a péptidos relativamente cortos, unidos a la toxina, que luego serían exportados hacia la luz del intestino por proteínas como Abcc2 u otros transportadores ABC apicales, y/o hacia la sangre. Como alternativa, parte de las proteínas unidas a MCLR podrían pasar a la sangre por exocitosis y luego ingresar al hígado por pinocitosis no específica (Rindler y Traber, 1988), donde serían metabolizadas y eliminadas (figura 1). El metabolismo en intestino explicaría la aparición en ese órgano de una fracción soluble de MCLR, que tiene muy baja capacidad de inhibición de PP, mientras que la hipótesis de la exocitosis-pinocitosis explicaría mejor la posterior aparición de MCLR unida a proteínas en hígado. Estas dos hipótesis no son mutuamente excluyentes.

Otro aspecto a destacar sobre la toxicidad de MCLR, es la detección de efectos a nivel de la composición de glicoconjugados en la pared intestinal de *O. hatcheri*. No existen antecedentes al respecto por lo que sería interesante profundizar en estos efectos. Los cambios en la composición de glicoconjugados pueden traer diversas consecuencias desfavorables, como afectar la capacidad de digestión, desatar reacciones inmunes, que perjudiquen el desarrollo del animal o reducir la capacidad del glicocálix de impedir el acceso de bacterias patógenas al epitelio. Por otro lado, estos cambios también podrían reflejar una respuesta adaptativa, que protege al individuo cuando está expuesto a una alta concentración ambiental de toxina. Es importante tener en cuenta que estos efectos fueron provocados sólo por MCLR, debido a que se utilizó toxina purificada de una floración de *Microcystis sp.* En el ambiente natural, la ingestión de células de cianobacterias podría provocar alteraciones de mayor magnitud o de distinto tipo, producto de la suma de otros compuestos como los lipopolisacáridos y ácidos grasos de cadena larga de la pared celular.

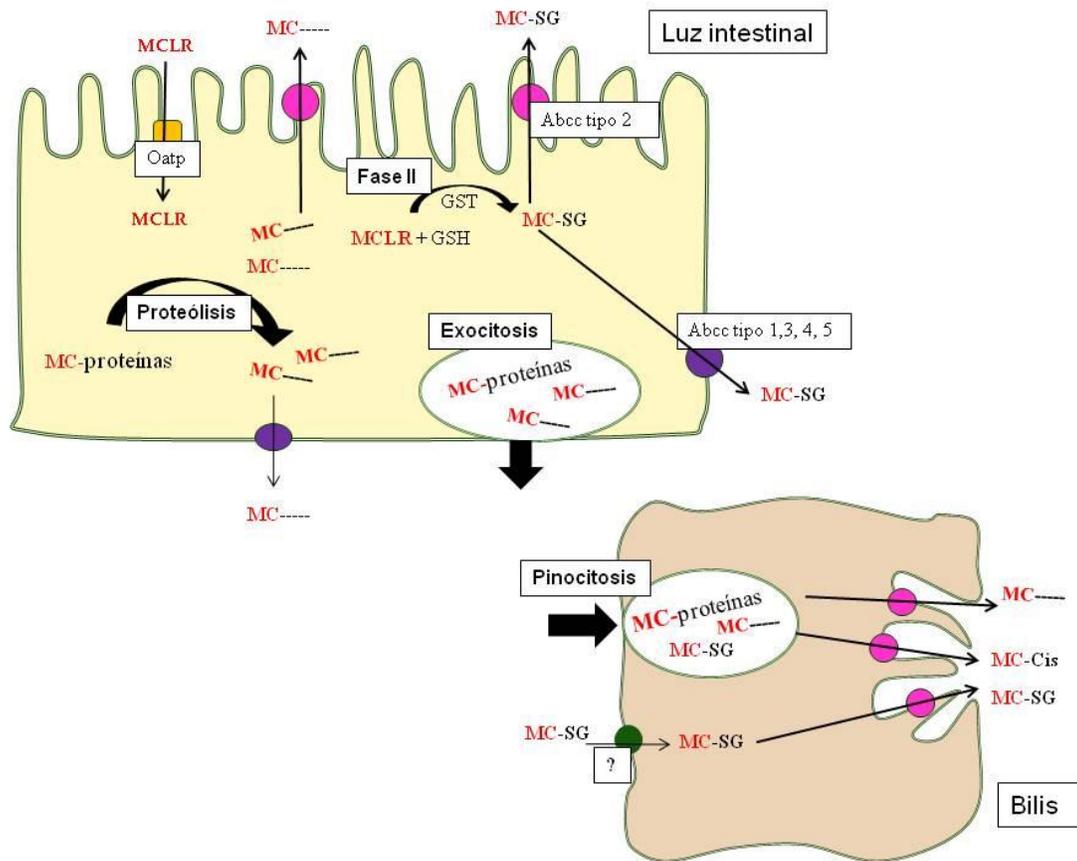


Figura 1. Esquema hipotético general que resume los mecanismos de detoxificación y transporte de MCLR propuestos, en base a los resultados y a las consideraciones finales de esta tesis. Abcc, proteína de resistencia a múltiples drogas; GSH, glutatión reducido; GST, enzima glutatión S-transferasa; MCLR, microcistina-LR; MC---, MCLR unida a fragmento peptídico de tamaño variable; MC-Cis, MCLR conjugada con cisteína; MC-SG, MCLR conjugada con GSH; MC-proteínas, MCLR unida covalentemente con proteínas intracelulares, Oatp, polipéptidos transportadores de aniones orgánicos. MCLR ingresa a los enterocitos a través de transportadores Oatp. En el interior celular se conjugan con GSH y el conjugado es eliminado de la célula por transportadores Abcc de ubicación apical y basolateral. Una parte de la MCLR que ingresa a los enterocitos se une a proteínas. Estas MC-proteínas pueden salir de la célula por exocitosis o ser degradadas a fragmentos proteicos más pequeños unidos a MCLR. Estos fragmentos proteicos podrían ser exportados por transportadores tipo Abcc o por exocitosis. Desde la sangre, estas formas de MCLR podrían ser captadas en el hígado a través de pinocitosis no específica. En los hepatocitos, la degradación de las MC-proteínas continuaría hasta fragmentos de unos pocos aminoácidos y/o hasta MC-Cis, que luego serían eliminados hacia los canalículos biliares por Abcc.

Riesgos para la para la salud humana e implicancias en la biología de O. hatcheri

Aunque en este trabajo no se mide acumulación de MCLR en músculo, en la literatura se describe que la acumulación de esta toxina en músculo de peces es muy inferior a la acumulación en otros tejidos como hígado, intestino y riñón. En la revisión de Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki (2011) se estima una acumulación en músculo 50 veces menor que la del hígado en el caso de peces omnívoros. En dicho estudio, sólo se estima MCLR extraíble (no se considera MCLR unida a proteínas) debido a que existe cierto consenso sobre que la fracción unida a proteínas no sería asimilada en el tracto digestivo humano (Ibelings y Chorus, 2007). Considerando el valor más alto de MCLR extraíble en metanol acumulada en el hígado de *O. hatcheri* (capítulo 1, tabla 1) de 1021 ng MCLR/g tejido a las 3 horas post-intoxicación, se podría estimar que en músculo se acumulan 20,42 ng/g. Un filete de 200 g tendría entonces 4,08 µg MCLR. Teniendo en cuenta que el consumo de pescado contaminado puede corresponder a una ingesta única (un día o fin de semana) o a un consumo estacional, donde se consume pescado contaminado durante varias semanas, Ibelings y Chorus (2007) proponen valores de ingesta tolerable de MCLR de 2,5 µg MCLR/kg masa corporal y de 0,4 µg /kg masa corporal por día, respectivamente (considerando que la MCLR ingerida proviene sólo del alimento). De esta manera, un adulto de 70 kg podría consumir hasta 28 µg MCLR diarios estacionalmente, mientras que un niño de 10 kg podría consumir 4 µg MCLR diarios en las mismas condiciones. Por lo tanto, los 4 µg MCLR calculados para 200 g de filete de *O. hatcheri* en las condiciones del experimento 2 del capítulo I, no superan estos límites. El consumo de *O. hatcheri* no constituiría peligro alguno para la salud de los adultos, aún con una ingesta estacional. En el caso de los niños, la ingesta estacional podría proveer cantidades de MCLR cercanas al límite recomendado.

Por otro lado, en la revisión de Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki (2011) se menciona que aunque la tendencia de las microcistinas es hacia la biodilución a lo largo de la cadena trófica, en los peces zooplanctívoros se observa biomagnificación de la concentración de estas toxinas. Por lo tanto, los peces zooplanctívoros podrían adquirir altas concentraciones de microcistina en la dieta. *O. hatcheri* es preponderantemente zooplanctívoro en los estadios juveniles, además de consumir cianobacterias directamente, lo que indica que durante esta etapa está más expuesto al riesgo causado por las floraciones de cianobacterias y el consumo humano de pejerreyes juveniles no debería recomendarse cuando se detecten floraciones.

Otro aspecto interesante a considerar es que *O. hatcheri* detoxifica la MCLR acumulada en tiempos relativamente cortos (24-48 horas). En caso de que se desarrollara la acuicultura de esta especie, esta característica permitiría la aplicación de técnicas para la limpieza de los individuos contaminados por floraciones tóxicas antes de sacrificarlos para consumo humano. En un embalse como el Exequiel Ramos Mexía, podrían trasladarse las jaulas a sectores de agua limpia (donde los efectos del viento y las corrientes mantengan alejadas las acumulaciones de cianobacterias). Luego de un período de 48 horas de detoxificación en estas aguas, los ejemplares estarían en condiciones de ser procesados para consumo humano con menos probabilidad de riesgo de ingerir cianotoxinas.

Diferencias interespecíficas de sensibilidad frente a MCLR

En preparaciones de intestino, el transporte de DNP-SG se inhibe a menores concentraciones de MCLR y MK571 en *O. mykiss* que en *O. hatcheri*. Además, 2,3 μM MCLR inhibe significativamente la actividad de de PP1 y PP2A en intestino de *O. mykiss*, mientras que en intestino de *O. hatcheri* no se observa esta inhibición aún a 6,8 μM . Tampoco se evidencia inhibición de PP en intestino de *O. hatcheri*

intoxicado *in vivo*. Esto sugiere que el intestino *O. hatcheri* es más resistente a MCLR que el de *O. mykiss*. Esta resistencia condice con la dieta omnívora/planctívora de *O. hatcheri* y con su capacidad de digestión de cianobacterias (capítulo 1), que hacen que sea probable que consuma cianotoxinas cuando se alimenta. Esta resistencia a MCLR podría ser comparable con la de la especie fitoplanctófaga *Hypophthalmichthys molitrix*, que se alimenta habitualmente de cianobacterias tóxicas (Xie et al., 2004, 2005). Sin embargo, en esta tesis no se ha estudiado la resistencia de *O. hatcheri* a altas concentraciones ambientales de MCLR, como sí se ha probado para *H. molitrix* (Xie et al., 2005).

El transporte de MCLR a través de Abcc en *O. mykiss* y en *O. hatcheri* debería ser tenido en cuenta en estudios de toxicología ambiental de elementos y compuestos tóxicos, que puedan interactuar con la misma vía de detoxificación. Por ejemplo el arsénico, el cobre y el mercurio también podrían ser detoxificados vía actividad GST y de transportadores Abcc (Miller et al., 2007; Bošnjak et al., 2009). La competencia por la vía de detoxificación podría llevar al aumento de las concentraciones intracelulares de MCLR y otros compuestos tóxicos, que estén presentes al mismo tiempo, aumentando su capacidad de daño. Por ejemplo, en esta tesis se vio que una concentración en principio inocua para el intestino de *O. mykiss* (1,14 μM MCLR) puede volverse tóxica al estar combinada con un compuesto que bloquea el transporte por Abcc.

Comprender las diferencias de sensibilidad entre especies de peces frente a MCLR así como su dinámica de acumulación y eliminación de toxinas, resulta de gran utilidad para evaluar y predecir el riesgo ambiental y económico asociado a la presencia de cianobacterias tóxicas sobre poblaciones naturales o comerciales de peces. Permitirá por ejemplo, seleccionar especies para la acuicultura que, además de ser importantes en cuanto a su aporte nutricional y valor comercial, sean resistentes a las cianotoxinas y no las acumulen significativamente.

Por último, es importante realizar una consideración sobre el origen de los individuos de *O. hatcheri* utilizados en esta tesis. En una parte importante del área de distribución natural de esta especie, la introducción de ejemplares de *O. bonariensis* ha dado como resultado híbridos fértiles y procesos de introgresión génica (Crichigno et al., 2013; 2014). Originalmente, ambas especies de pejerrey se diferenciaban, entre otros aspectos, por su distribución geográfica. *O. hatcheri* se describe como especie típica de la región suroeste de Cuyo y la Patagonia (Aigo et al., 2008) mientras que *O. bonariensis* es característica del centro-este de la Argentina (región pampeana) (López et al., 2008). Sin embargo, la introducción antropogénica de *O. bonariensis* en ambientes de *O. hatcheri* generó flujos génicos entre ambas especies. En varias regiones de la Patagonia se observa la aparición de individuos con morfología intermedia entre *O. hatcheri* y *O. bonariensis* y en particular, la región de donde provinieron los ejemplares utilizados para esta tesis, se encuentra dentro de una zona considerada de hibridización (Crichigno et al., 2013). Lamentablemente, no se han realizado estudios morfológicos ni moleculares que permitan evaluar el grado de introgresión génica que presentaban los ejemplares utilizados en esta tesis. Sería importante a futuro estudiar si los resultados obtenidos en esta tesis son representativos de una población híbrida en particular o se pueden generalizar para las especies *O. hatcheri* y *O. bonariensis* puros, híbridos e introgresados.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados de este trabajo se puede concluir que:

- ✚ *O. hatcheri* es capaz de digerir cianobacterias tóxicas y acumular la cianotoxina MCLR en intestino e hígado.
- ✚ En intestino e hígado *O. hatcheri* la MCLR se acumula mayoritariamente unida a proteínas. Las proteínas unidas a MCLR son degradadas a fragmentos proteicos pequeños, que son posteriormente excretados hacia la luz del intestino y/o hacia la bilis y, probablemente, también hacia la orina.
- ✚ MCLR se elimina de los enterocitos hacia el lumen intestinal a través de proteínas tipo Abcc apicales tanto en *O. hatcheri* como en *O. mykis*. Otra fracción de la toxina se transporta hacia la sangre por proteínas tipo Abcc basolaterales, entre las que podría estar Abcc4.
- ✚ MCLR altera la composición de glicoconjugados, identificados mediante el uso de lectinas, en el intestino de *O. hatcheri*.

BIBLIOGRAFIA

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Aigo, J., Cussac, V., Peris, S., Ortubay, S., Gómez, S., López, H., Gross, M., Barriga, J., Battini, M. 2008. Distribution of introduced and native fish in Patagonia (Argentina): patterns and changes in fish assemblages. *Rev. Fish. Biol. Fisheries*, 14, 387-408.
- Agelet, L., Manes, J., Vigliano, F.A., Cerutti, P.A. 2003. Estudio histológico e histoquímico del tubo digestivo de juveniles de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Universidad Nacional de Rosario. Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. <http://www.fveter.unr.edu.ar/upload/Jornadas2003.pdf>
- Albertus, J.A., Laine, R.O. 2001. Enhanced xenobiotic transporter expression in normal teleost hepatocytes: response to environmental and chemotherapeutic toxins. *J. Exp. Biol.* 204, 217-227.
- Amado, L.L., Monserrat, J.M. 2010. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: why and how. *Environ. Int.* 36, 226-235.
- Amé, M.V., Baroni, M.V., Galanti, L.N., Bocco, J.L., Wunderlin, D.A. 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74, 1179-1186.
- Amorim, A., Vasconcelos, V. 1999. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 37 (7), 1041-1052.
- Andersen, R.J., Luu, H.A., Chen, D.Z. X., Holmes, C.F.B., Kent, M.L., LeBlanc, M., 'Max' Taylor, F.J.R., Williams, D.E. 1993. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon 'netpen liver disease'. *Toxicon* 31, 1315-1323.
- Ardanaz, S.M. 2010. Determinación de microcistinas en aguas de captación y tratadas. Tesina de licenciatura. Universidad de Belgrano. Buenos Aires, Argentina, 48 pp.
- Atencio, L., Moreno, I., Jos, A., Pichardo, S., Moyano, R., Blanco, A., Cameán, A.M. 2008. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenta (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon* 52 (1), 1-12.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181, 441-446.
- Azevedo, S.M.F.O., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Namikoshi, M. 1994. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Appl. Phycol.* 6, 261-264.

- Babica, P., Blaha, L., Marsalek, B. 2006. Exploring the natural role of microcystins - review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.* 42 (1), 9-20.
- Backer, L.C. 2002. Cyanobacterial harmful algal blooms (cyanoHABs): Developing a public health response. *Lake Reserv. Manage.* 18 (1), 20-31.
- Badger, M.R., Price, G.D. 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Experim. Bot.* 54 (383), 609-622.
- Bard, S.M. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357-389.
- Bastviken, D.T.E., Caraco, N.F., Cole, J.J. 1998. Experimental measurements of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) impacts on phytoplankton community composition. *Freshwater Biol.* 39, 375-386.
- Beattie, K.A., Ressler, J., Wiegand, C., Krause, E., Steinberg, C.E., Pflugmacher, S. 2003. Comparative effects and metabolism of two MCYSTs and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquat. Toxicol.* 62, 219-226.
- Belinsky, M.G., Guo, P., Lee, K., Zhou, F., Kotova, E., Grinberg, A. 2007. Multidrug resistance protein 4 protects bone marrow, thymus, spleen, and intestine from nucleotide analogue-induced damage. *Cancer Res.* 67, 262-8.
- Best, J.H., Eddy, F.B., Codd, G.A. 2003. Effects of *Microcystis* cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquat. Toxicol.* 64, 419-426.
- Beuge, J.A., Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52, 302-310.
- Bieczynski, F., Bianchi, V.A., Luquet, C.M. 2013. Accumulation and biochemical effects of microcystin-LR on the Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*) fed with the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Fish Physiol. Biochem.* 39 (5), 1309-1321.
- Bieczynski, F., De Anna, J.S., Pirez, M., Brena, B.M., Villanueva, S.S.M., Luquet, C.M. 2014. Cellular transport of microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across the intestinal wall: Possible involvement of multidrug resistance-associated proteins. *Aquat. Toxicol.* 154, 97-106.
- Bishop, C.T., Anet, E.F.L.J., Gorham, P.R. 1959. Isolation and identification of the past-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 453-471.

- Boaru, D.A., Dragos, N., Schirmer, K. 2006. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: a comparative study. *Toxicology* 218, 134-148.
- Bollen, M. 2001. Combinatorial control of protein phosphatase-1. *TRENDS Biochem. Sci.* 26 (7), 426-431.
- Bonilla, S., Aubriot, L., 2009. Capítulo 1: Biología, floraciones y distribución de las cianobacterias. En: *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay, Manual para la identificación y medidas de gestión*. Bonilla, S. (Ed), publicado por Programa Hidrológico Internacional (PHI) de la Oficina Regional de Ciencia para América Latina y el Caribe de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) y la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, Uruguay, 105 pp.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. 1999. The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 347-357.
- Borst, P., de Wolf, C., van de Wetering, K. 2007. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers. Arch-Eur. J. Physiol.* 453, 661-673.
- Bošnjak, I., Uhlinger, K.R., Heim, W., Smital, T., Franekić-Čolić, J., Coale, K., Epel, D., Hamdoun, A. 2009. Multidrug efflux transporters limit accumulation of inorganic, but not organic, mercury in sea urchin embryos. *Environ. Sci. Technol.* 43, 8374-8380.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brena, B., Bonilla, S., 2009. Capítulo 4: Producción de toxinas y otros metabolitos. En: *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay, Manual para la identificación y medidas de gestión*. Bonilla, S. (Ed), publicado por Programa Hidrológico Internacional (PHI) de la Oficina Regional de Ciencia para América Latina y el Caribe de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) y la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, Uruguay. 1-105 pp
- Brena, M., Díaz, L., Sienna, D., Ferrari, G., Ferraz, N., Hellman, U., Gonzalez-Sapienza, G., Last, Jerold A. 2006. ITREOH building of regional capacity to monitor recreational water: development of a non-commercial microcystin ELISA and its impact on public health policy. *Int. J. Occup. Environ. Health* 12, 377-385.

- Burkhardt-Holm, P. 1997. Lectin histochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill and skin. *The Histochemical Journal* 29 (11-12), 893-899.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A. 1995. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial toxin microcystin-LR and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout (*Salmo trutta* L.) *J. Fish Biol.* 46, 1042-1054.
- Bury, N.R., Newlands, A.D., Eddy, F.B., Codd, G.A. 1998. *In vivo* and *in vitro* intestinal transport of 3H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 42, 139-148.
- Cain, K., Swan, C., 2011. Barrier function and immunology. In: Grosell, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Fish Physiology: The Multifunctional Gut of Fish*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 112-135 pp.
- Caminada, D., Zaja, R., Smitalc, T., Fent, K. 2008. Human pharmaceuticals modulate P-gp1 (ABCB1) transport activity in the fish cell line PLHC-1. *Aquat. Toxicol.* 90, 214-222.
- Campos, A., Vasconcelos, V. 2010. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 268-287.
- Carbis, C., Rawlin, G., Mitchell, G., Anderson, J., and McCauley, I. 1996. The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystin by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *J. Fish Dis.* 19, 199-207.
- Carmichael, W.W. 1988. Toxins of freshwater algae. In *Handbook of natural toxins*, Ed. Tu, A.T., New York, 121-147 pp.
- Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. *J. Ap. Bacteriol.* 72, 445-459.
- Carmichael, W.W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270, 78-86.
- Carmichael, W.W., An, J. 1999. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Nat. Toxins* 7, 377-385.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109, 663-668.
- Carvajal, G. 2011. Ocurrencia de floraciones de cianobacterias tóxicas en cuerpos de agua dulce, Argentina. Estudio de campo y análisis de datos. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, 179 pp.

- Carvajal, J.A., Germain, A.M., Huidobro-Toro, J.P., Weiner, C.P. 2000. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J. Cell. Physiol.* 184 (3), 409-420.
- Castagnino, R.A., 2005. Identificación de glicoconjugados mediante la técnica de lectinhistoquímica en el tracto intestinal del pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Tesis. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina, 92 pp.
- Catania, V.A., Sanchez Pozzi, E.J., Luquita, M.G., Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Jones, B., Mottino, A.D. 2004. Co-regulation of expression of phase II metabolizing enzymes and multidrug resistance-associated protein 2. *Ann. Hepatol.* 3, 11-17.
- Cazenave, J., Bistoni, M.A., Pesce, S.F., Wunderlin, D.A. 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76, 1-12.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., Amé, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C. 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. *Aquat. Toxicol.* 75, 178-190.
- Chae, C., Lee, Y. 1995. Age-related lectin histochemical changes in the porcine small intestine, *J. Vet. Med. Sci.* 57 (5), 883-889.
- Chan, K.M., 1992. P-glycoprotein genes in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*: isolation of two types of genomic clones carrying 3' terminal exons. *Biochim. Biophys. Acta* 1171, 65-72.
- Chan, L.M.S., Lowes, S., Hirst, B.H. 2004. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 25- 51.
- Chorus, I., Bartram, J. (Eds). 1999. Toxic cyanobacteria: a guide to their public health consequences, monitoring and management. first ed. WHO, New York, 400 pp.
- Codd, G.A., Azevedo, S.M.F.O., Bagchi, S.N., Burch, M.D., Carmichael, W.W., Harding, W.R., Kaya, K., Utkilen, H.C. 2005a. CYANONET A Global Network for Cyanobacterial Bloom and Toxin Risk Management. Initial Situation Assessment and Recommendations. Technical Documents in Hydrology No. 76 UNESCO, Paris, 2005. International Hydrological Programme (IHP) of the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), France.

- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S. 2005b. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 264-272.
- Compagnucci, L.D., Semenas, L.G., Ubeda, C.A. 1992. Nutrición y alimentación en pisciculturas rurales. *Rev. Argentina de producción Animal* 12 (1), 95-113.
- Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Wiegand, C. 2008. Multi-xenobiotic-resistance: a possible explanation for the insensitivity of bivalves towards cyanobacterial toxins. *Toxicon* 52, 936-943.
- Costa, J., Reis-Henriques, M.A., Castro, L.F.C., Ferreira, M. 2012. Gene expression analysis of ABC efflux transporters, CYP1A and GST α in Nile tilapia after exposure to benzo(a)pyrene. *Comp. Biochem. Physiol. C* 155, 469-482.
- Craig, M., Luu, H.A., McCreedy, T., Williams, D.E., Andersen, R.J., and Holmes, C. F.B. 1996. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and 2A protein phosphatases. *Biochem. Cell. Biol.* 74, 569-578.
- Crichigno, S.A., Conte-Grand, C., Battini, M., Cussac, V. 2013. Cephalic morphological variation in freshwater silversides *Odontesthes hatcheri* and *Odontesthes bonariensis* in Patagonia: introgression and ecological relationships. *J. Fish Biol.* 83, 542-559.
- Crichigno, S.A., Shohei Hattori, R., Strüssmann, C.A., Cussac, V. 2014. Morphological comparison of wild, farmed and hybrid specimens of two South American silversides, *Odontesthes bonariensis* and *Odontesthes hatcheri*. *Aquacult. Res.* 1-12.
- Daborn, K., Cozzi, R.R.F., Marshall, W.S. 2001. Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 204, 1889-1899.
- Dawson, R.M. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36 (7), 953-962.
- Deblois, C.P., Giani, A., Bird, D.F. 2011. Experimental model of microcystin accumulation in the liver of *Oreochromis niloticus* exposed subchronically to a toxic bloom of *Microcystis sp.* *Aquat. Toxicol.* 103, 63-70.
- De León, L., Yunes, J.S. 2001. First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environ. Toxicol.* 16, 110-112.
- De Souza Votto, A.P., Renon, V.P., Yunes, J.S., Rumjanek, V.M., Marques Capella, M.A., Neto, V.M., Sampaio de Freitas, M., Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Trindade,

- G.S. 2007. Sensitivity to microcystins: a comparative study in human cell lines with and without multidrug resistance phenotype. *Cell Biol. Int.* 31 (11), 1359-66.
- De Waart, D.R., van de Wetering, K., Kunne, C., Duijst, S., Paulusma, C.C., Elferink, R.P.J.O. 2012. Oral Availability of Cefadroxil Depends on ABCC3 and ABCC4. *Drug Metab. Dispos.* 40 (3), 515-521.
- Dezfuli, B.S., Pironi, F., Campisi, M., Shinn, A.P., Giari, L. 2010. The response of intestinal mucous cells to the presence of enteric helminths: their distribution, histochemistry and fine structure. *J. Fish Dis.* 33, 481-488.
- Díaz, A.O., García, A.M., Escalante, A.H., Goldemberg, A.L. 2010. Glycoproteins histochemistry of the gills of *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinopsidae). *J. Fish Biol.* 77, 1665-1673.
- Díaz, A.O., García, A.M., Goldemberg, A.L. 2005. Glycoconjugates in the branchial mucous cells of *Cynoscion guatucupa* (cuvier, 1830) (Pisces: Sciaenidae). *Sci. Mar.* 69, 545-553.
- Díaz, A.O., García, A.M., Goldemberg, A.L. 2008. Glycoconjugates in the mucosa of the digestive tract of *Cynoscion guatucupa*: A histochemical study. *Acta Histochem.* 110, 76-85.
- Díaz, A.O., Tano de la Hoz, M.F., García, A.M., Escalante, A.H., Goldemberg, A.L. 2012. Characterization of glycoconjugates in the pharyngeal cavity and the oesophagus of *Odontesthes bonariensis* by lectins. *Biotemas* 25 (4), 157-163.
- Dietrich, D., Hoeger, S. 2005. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 273-289.
- Ding, W-X, Shen, H-M, Ong, C-N. 2001. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 64, 507-19.
- Dionisio Pires, L.M., Karlsson, K.M., Meriluoto, J.A.O., Kardinaal, E., Visser, P.M., Siewertsen, K., Van Donk, E., Ibelings, V.W. 2004. Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Aquatic. Toxicol.* 69, 385-396.
- Domeneghini, C., Pannelli Straini, R., Veggetti, A. 1998. Gut glycoconjugates in *Sparus aurata* L. (Pisces, Teleostei). A comparative histochemical study in larval and adult ages. *Histolo. Histopathol.* 13, 359-372.

- Dörr, F.A., Pinto, E., Soares, R.M., S.M.F.O. Azevedo. 2010. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon* 56, 1247-1256.
- Echenique, R., Aguilera, A. 2009. Capítulo III: Floraciones de Cyanobacteria toxígenas en la República Argentina: antecedentes. En: *Cianobacterias y Cianotoxinas: Identificación, Toxicología, Monitoreo y Evaluación de riesgo*. Giannuzzi, L. (Ed.), Ediciones Moglia, Corrientes, 1° ed., 238 pp, ISBN 978-987-05-5749-4.
- Echenique, R., Rodríguez, J., Caneo, M., Gianuzzi, L., Barco, M., Rivera, J., Caixach, J., Andrinolo, D. 2008. Microcystins in the drinking water supply in the cities of Ensenada and La Plata (Argentina). *Anais do XICBFic Livros do Museu Nacional, Brasil*, 125-129.
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Engström-Öst, J. 2002. Effects of cyanobacteria on plankton and planktivores. W. & A. de Nottbeck Foundation Sci. Rep. 24, 1-25. ISBN 951-98521-4-X; ISBN 952-10-0267-0
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., Macmanus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T. 2008. Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3914-3920.
- Eriksson, J.E., Toivola, E., Meriluoto, J.A.O., Karaki, H., Han, Y.G., Hartshorne, D. 1990. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (3), 1347-53.
- Ernst, B., Hoeger, S.J., O'Brien, E., Dietrich, D.R. 2006. Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquat. Toxicol.* 79, 31-40.
- Evers, R., Kool, M., Smith, A.J., van Deemter, L., de Haas, M., Borst, P. 2000. Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-MRP1- and MRP2-mediated transport. *Cancer Res. Campaign.* 83 (3), 366-374.
- Falconer, I.R., Jackson, A.R.B., Langler, J., Runnegar, M.T. 1981. Liver Pathology in Mice in Poisoning by the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust. J. Bioi. Sci.* 34, 179-87.
- Falconer, I.R., Yeung, D.S. 1992. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem. Biol. Interact.* 81, 181-196.

- Falk, P., Roth, K.A., Gordon, J.I. 1994. Lectins are sensitive tools for defining the differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. *Am. J. Physiol. Gas. L.* 266 (6), 987-1003.
- Fardel, O., Jigorel, E., Le Vee, M., Payen, L. 2005. Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. *Biomed. Pharmacother.* 59, 104-114.
- FAO. 2013. Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura. <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/es>
- Ferrada, M.A. 2010. Incidencia de cianotoxinas en la cría del pejerrey patagónico, (*Odontesthes hatcheri*, Eigenmann, 1909) en balsas-jaulas en el embalse Ezequiel Ramos Mexía, Neuquén. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche, 73 pp.
- Ferrão-Filho, A.S., Kozłowsky-Suzuki, B. 2011. Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. *Mar. Drugs* 9, 2729-2772.
- Ferrão-Filho, A.S., Kozłowsky-Suzuki, B., Azevedo, S.M.F.O. 2002. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquat. Toxicol.* 59, 201-208.
- Ferreira, M., Costa, J., Reis-Henriques, M.A. 2014a. ABC transporters in fish species: a review. *Fr. Physiol.* 5 (266), 1-12.
- Ferreira, M., Santos, P., Rey-Salgueiro, L, Zaja, R., Reis-Henriques, M.A., Smital, T. 2014b. The first demonstration of CYP1A and the ABC protein(s) gene expression and activity in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) primary hepatocytes. *Chemos.* 100, 152-159.
- Ferriz, R.A. 1993/94. Algunos aspectos de la dieta de cuatro especies ícticas del río Limay (Argentina). *Revista de Ictiología* 2/3 (1/2), 1-7.
- Feurstein, D., Kleinteich, J., Heussner, A.H., Stemmer, K., Dietrich, D.R., 2010. Investigation of Microcystin Congener-Dependent Uptake into Primary Murine Neurons. *Environ. Health Persp.* 118, 10.
- Fiertak, A., Kilarski, W.M. 2002. Glycoconjugates of the intestinal goblet cells of four cyprinids. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1724-1733.
- Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B. 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 257-263.

- Fischer, W.J., Dietrich, D.R. 2000. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 73–81.
- Fischer, S., Klüver, N., Burkhardt-Medicke, K., Pietsch, M., Schmidt, A-M., Wellner, P., Schirmer, K., Luckenbach, T. 2013. Abcb4 acts as multixenobiotic transporter and active barrier against chemical uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *BMC Biol.* 11 (69), 1-16.
- Fischer, S., Lončar, J., Zaja, R., Schnell, S., Schirmer, K., Smital, T., Luckenbach, T. 2011. Constitutive mRNA expression and protein activity levels of nine ABC efflux transporters in seven permanent cell lines derived from different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 101, 438–446.
- Fischer, S., Pietsch, M., Schirmer, K., Luckenbach, T., 2010. Identification of multi-drug resistance associated proteins MRP1 (ABCC1) and MRP3 (ABCC3) from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Environ. Res.* 69, 7–10.
- Fowler, J., Cohen, L., Jarvis, P. 1998. *Practical Statistics for Field Biology*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England. 2nd Edition, 259 pp.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A. (Eds). 2009. *Atlas of fish histology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, 219 pp.
- Giannuzzi, L., Carvajal, G., Corradini, M. G., Araujo Andrade, C., Echenique, R., Andrinolo, D. 2012. Occurrence of Toxic Cyanobacterial Blooms in Rio de la Plata Estuary, Argentina: Field Study and Data Analysis. *J. Toxicol.* 1-15.
- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., Andrinolo, D. 2011. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in Recreational Water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar. Drugs* 9, 2164-2175.
- Gorham, P.R., McLachlan, J., Hammer, U.T., Kim, W.K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 15, 796–804.
- Gotoh, Y., Suzuki, H., Kinoshita, S., Hirohashi, T., Kato, Y., Sugiyama, Y. 2000. Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 433–439.
- Gottesman, M.M., Pastan, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427.

- Guzman, R.E., Solter, P.F. 2002. Characterization of Sublethal Microcystin-LR Exposure in Mice. *Vet. Pathol.* 39, 17-26.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. Free radical in biology and medicine. Fourth Edition. Ed. Oxford University press. New York, 851 pp.
- Hagenbuch, B., Meier, P.J. 2003. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1609, 1-18.
- Hao, L., Xie, P., Fu, J., Li, G., Xiong, Q., Li, H. 2008. The effect of cyanobacterial crude extract on the transcription of GST mu, GST kappa and GST rho in different organs of goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.* 90, 1-7.
- Harada, K.I., Oshikata, M., Uchida, H., Suzuki, M., Kondo, F., Sata, K., Ueno, Y., Yu, S.Z., Chen, G.C. 1996. Detection and identification of microcystins in the drinking water of Haiman city, China. *Nat. Toxins* 4, 277-283.
- Havens, K.E., 2008. Chapter 33: Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. In: *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Hudnell, H.K. (Ed). Springer, New York.
- He, J., Chen, J., Xie, P., Zhang, D., Li, G., Wu, L., Zhang, W., Guo, X., Li, S. 2012. Quantitatively evaluating detoxification of the hepatotoxic microcystins through the glutathione and cysteine pathway in the cyanobacteria-eating bighead carp. *Aquat. Toxicol.* 116, 61-68.
- Hemmer, M., Courtney, L., Ortego, L. 1995. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in teleost tissues using mammalian polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Exp. Zool.* 272, 69-77.
- Heresztyn, T., Nicholson, B.C. 2001. Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay. *Water. Res.* 35 (13), 3049-3056.
- Hinchman, C.A., Matsumoto, H., Simmons, T.W., Ballatori, N. 1991. Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J. Biol. Chem.* 266, 22179-22185.

- Honkanen, E., Codispoti, A., Tse, K., Boynton, A.L. 1994. Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon* 32, 339-350.
- Honkanen, R.E., Zwiller, J., Moore, R.E., Daily, S.L., Khatra, B.S., Dukelow, M., Boynton, A.L. 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 265, 19401-19404.
- Hooser, S.B. 2000. Fulminant hepatocyte apoptosis *in vivo* following microcystin-LR administration to rats. *Toxicol. Pathol.* 28, 726-733.
- Hooser, S.B., Beasley, V.R., Basgall, E.J., Carmichael, W.W., Haschek, W.M. 1990. Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. *Vet. Pathol.* 27, 9-15.
- Hooser, S.B., Beasley, V.R., Lovell, R.A., Carmichael, W.W., Haschek, W.M. 1989. Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice. *Vet. Pathol.* 26, 246-252.
- Horn, M.H., Gawlicka, A.K., German, D.P., Logothetis, E.A., Cavanagh, J.W., Boyle, K.S. 2006. Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory, and carnivory. *Mar. Biol.* 149, 1237-1245.
- Hualde, J.P., Torres, W.D.C., Moreno, P., Ferrada, M., Demicheli, M.A., Molinari, L.J., Luquet, C.M. 2011. Growth and feeding of patagonian pejerrey *Odontesthes hatcheri* reared in net cages. *Aquac. Res.* 42, 754-763.
- Ibelings, B.W., Chorus, I. 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: a review. *Environ. Pollut.* 150, 177-192.
- Ishikawa, T. 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* 17, 463-468.
- Ito, E., Kondo, F., Harada, K. 2000. First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. *Toxicon* 38, 37-48.
- Ito, E., Takai, A., Kondo, F., Masui, H., Imanishi, S., Harada, K. 2002. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon* 40 (7), 1017-1025.
- Johansson, M.E.V., Sjövall, H., Hansson, G.C. 2013. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10 (6), 352-361.

- Jos, A., Pichardo, S., Prieto, A.I., Repetto, G., Vázquez, C.M., Moreno, I., Cameán, A.M. 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 72, 261-271.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 1-9.
- Karlgren, M., Vildhede, A., Norinder, U., Wisniewski, J.R., Kimoto, E., Lai, Y., Haglund, U., Artursson, P. 2012. Classification of inhibitors of hepatic organic anion trans-transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions. *J. Med. Chem.* 55, 4740-4763.
- Kaya, K., Sano, T. 1999. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d₃)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d₃) as the internal standard. *Anal. Chem. Acta* 386, 107-112.
- Kent, M.L. 1990. Netpen liver disease (NLD) of salmonid fishes reared in sea water: species susceptibility, recovery, and probable cause. *Dis. aquat. Org.* 8, 21-28.
- Klaassen, C.D., Aleksunes, L.M. 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* 62, 1-96.
- Kleinow, K.M., Doi, A.M., Smith, A.A. 2000. Distribution and inducibility of P-glycoprotein in the catfish: immunohistochemical detection using the mammalian C-219 monoclonal. *Mar. Environ. Res.* 50, 313-317.
- Komárek, J., Zapomělová, E. 2007. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* - 1. part: coiled types. *Fottea, Olomouc*, 7 (1), 1-31.
- Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Okumura, M., Ishikawa, N., Harada, K.I., Matsuura, K., Murata, H., Suzuki, M. 1992. Formation, characterization and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of the toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 591-596.
- Kondo, F., Matsumoto, H., Yamada, S., Ishikawa, N., Ito, E., Nagata, S., Ueno, Y., Suzuki, M., Harada, K. 1996. Detection and Identification of Metabolites of *Microcystins* Formed *in Vivo* in Mouse and Rat Livers. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 1355-1359.
- Konst, H., McKercher, P.D., Gorham, P.R., Robertson, A., and Howell, J. 1965. Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 29, 221-228.

- Kotak, B.G., Semalulu, S., Fritz, D.L., Prepas, E.E., Hrudey, S.E., Coppock, R.W. 1996. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 34, 517-525.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J. 1999. Human health aspects. In: Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus, I., Bartram, J. (Eds). First ed. WHO, New York, 400 pp.
- Kurelec, B. 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 23-43.
- Kurelec, B. 1997. A New Type of Hazardous Chemical: The Chemosensitizers of Multixenobiotic Resistance. *Environ. Health Perspect.* 105 (4), 855-860.
- Landsberg, J.H. 2002. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Rev. Fish. Sci.* 10 (2), 113-390.
- Lawton, L., Edwards, C. 2001. Purification of microcystins. *J. Chromatograp. A.* 912, 191-209.
- Lemaitre, C., Orange, N., Saglio, P., Saint, N., Gagnon, J., Molle, G. 1996. Characterization and ion channel activities of novel antibacterial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). *Eur. J. Biochem.* 240, 143-149.
- Li, W., Chen, J., Xie, P., He, J., Guo, X., Tuo, X., Zhang, W., Wu, L. 2014. Rapid conversion and reversible conjugation of glutathione detoxification of microcystins in bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Aquat. Toxicol.* 147, 18-25.
- Li, X-Y., Chung, I-K., Kim, J-I., Lee, J-A. 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon* 44, 821-827.
- Li, X-Y., Chung, I-K., Kim, J-I., Lee, J-A. 2005. Oral exposure to *Microcystis* increases activity-augmented antioxidant enzymes in the liver of loach (*Misgurnus mizolepis*) and has no effect on lipid peroxidation. *Comp. Biochem. Phys. C* 141(3), 292-296.
- Li, C., Krishnamurthy, P.C., Penmatsa, H., Marrs, K.L., Wang, X.Q., Zaccolo, M., Jalink, K., Li, M., Nelson, D.J., Schuetz, J.D. 2007. Spatio temporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia. *Cell* 131, 940-951.
- Li, X-Y., Liu, Y., Song, L., Liu, J. 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon* 42, 85-89.

- Lončar, J., Popović, M., Zaja, R., Smital, T. 2010. Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Phys. C* 151, 209–215.
- Long, Y., Li, Q., Zhong, S., Wang, Y., Cui, Z. 2011. Molecular characterization and functions of zebrafish ABCC2 in cellular efflux of heavy metals. *Comp. Biochem. Phys. C* 153, 381–391.
- López, H. L., Menni, R. C., Donato, M., Miquelarena, A. M. 2008. Biogeographical revision of Argentina (Andean and Neotropical Regions): an analysis using freshwater fishes. *J. Biogeogr.* 35, 1564–1579.
- Loretz, C.A. 1995. Electrophysiology of ion transport in teleost intestinal cells. In: Wood, C.H., Shuttleworth, T.J. (Eds). *Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation*. London, UK, Academic Press, 25–26.
- Lozano Paredes, V. 2013. Identificación de genes implicados en la eliminación de biotoxinas en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: clonación y expresión de los cDNA que codifican para tres proteínas transportadoras ABC pertenecientes a las subfamilias C (proteínas MRP) y G. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 250 pp.
- Lu, H., Choudhuri, S., Ogura, K., Csanaky, I.L., Lei, X., Cheng, X., Song, P.Z., Klaassen, C.D. 2008. Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR. *Toxicol. Sci.* 103, 35–45.
- Luckenbach, T., Corsi, I., Epel, D. 2004. Fatal attraction: Synthetic musk fragrances compromise multitoxin defense systems in mussels. *Mar. Environ. Res.* 58, 215–219.
- Luckenbach, T., Epel, D. 2005. Nitromusk and Polycyclic Musk Compounds as Long-Term Inhibitors of Cellular Xenobiotic Defense Systems Mediated by Multidrug Transporters. *Environ. Health Perspect.* 113, 17–24.
- Luckenbach, T., Fischer, S., Sturm, A. 2014. Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comp. Biochem. Phys. C* 165, 28–52.
- MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A. 1990. Cyanobacterial MCYST-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264, 187–192.

- MacKintosh, R.W., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T.W., Cohen, P., MacKintosh, C. 1995. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* 371, 236-240.
- Magalhães, V.F., Marinho, M.M., Domingos, P., Oliveira, A.C., Costa, S.M., Azevedo, L.O., Azevedo, S.M.F.O. 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, 42, 289-295.
- Magalhães, V.F., Soares, R.M., Azevedo, S.M.F.O. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39, 1077-1085.
- Malbrouck, C., Kestmont, P., 2006. Effects of microcystins on fish. *Environ. Toxicol.Chem.* 25 (1), 72-86.
- Malbrouck, C., Trausch, G., Devos, P., Kestemont, P. 2003. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Phys. C* 135, 39-48.
- Marshall, W.S., Grosell, M. 2006. Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (Eds.), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 177-230.
- Masereeuw, R., Terlouw, S.A., Van Aubel, R.A.M.H., Russel, F.G.M., Miller, D.S. 2000. Endothelin B receptor-mediated regulation of ATP-driven drug secretion in renalproximal tubule. *Mol. Pharmacol.* 57, 59-67.
- McGowan, S., Britton, G., Haworth, E., Moss, B. 1999. Ancient blue-green blooms. *Limnol. Oceanogr.* 44, 436-439.
- Meier-Abt, F., Hammann-Hanni, A., Stieger, B., Ballatori, N., Boyer, J.L. 2007. The organic anion transport polypeptide 1d1 (Oatp1d1) mediates hepatocellular uptake of phalloidin and microcystin into skate liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218, 274-279.
- Meyer, W., Luz, S., Schnapper, A. 2009. Lectin histochemical aspects of mucus function in the oesophagus of the Reticulated Python (*Python reticulates*). *Anatomia, Histologia, Embryologia* 38, 316-318.
- Mikhailov, A., Härmälä-Braskén, A.S., Hellman, J., Meriluoto, J., Eriksson, J.E. 2003. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chem-Biol. Interact.* 142, 223-237.

- Miller, D.S., Graeff, C., Droulle, L., Fricker, S., Fricker, G. 2002. Xenobiotic efflux pumps in isolated fish brain capillaries. *Am. J. Physiol-Reg. I.* 282,191-198.
- Miller, D.S., Masereeuw, R., Henson, J., Karnaky, K.J. 1998. Excretory transport of xenobiotics by dogfish shark rectal gland tubules. *Am. J. Physiol.-Reg. I.* 275, 697-705.
- Miller, D.S., Shaw, J.R., Stanton, C.R., Barnaby, R., Karlson, K.H., Hamilton, J.W., Stanton, B.A. 2007. MRP2 and acquired tolerance to inorganic arsenic in the kidney of killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Toxicol. Sci.* 97 (1), 103-110.
- Ming, X., Thakker, D.R. 2010. Role of basolateral efflux transporter MRP4 in the intestinal absorption of the antiviral drug adefovir dipivoxil. *Biochem. Pharmacol.* 79 (3), 455-462.
- Mohamed, Z.A. 2001. Accumulation of cyanobacterial toxins by *Daphnia* in some Egyptian irrigation canals. *Ecotox. Environ. Saf.* 50, 4-8.
- Molina, R., Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Moyano, R., Monterde, J.G., Cameán, A. 2005. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis sp.*) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicol.* 46, 725-735.
- Mottino, A.D., Hoffman, T., Jennes, L., Cao, J., Vore, M. 2001. Expression of multidrug resistance-associated protein 2 in small intestine from pregnant and postpartum rats. *Am. J. Physiol. Gastr. L.* 280, 1261-1273.
- Mottino, A.D., Hoffman, T., Jennes, L., Vore, M. 2000. Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 717-723.
- Mullor, J.B. 1945. Toxic algae (Algas tóxicas). *Rev. Sanid., Asist. Social Trabajo* 1:95. En: Carvajal, G. 2011. Ocurrencia de floraciones de cianobacterias tóxicas en cuerpos de agua dulce, Argentina. Estudio de campo y análisis de datos. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, 179 pp.
- Mur, L.R., Skulberg, O.M., Utkilen, H. 1999. Chapter 2: Cyanobacteria in the environment, in: *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus, I., Bartram, J. (Eds). first ed. WHO, New York, NY, 400 pp.
- Oliver, C.J., Shenolikar, S. 1998. Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front. Biosci.* 3, 961-972.

- Oostendorp, R.L., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M. 2009. The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. *Cancer Treat. Rev.* 35, 137-147.
- Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V. 2007. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ. Int.* 33, 1070-1089.
- Othaz Brida, M.A., Agúndez, J.P., Gil, M.I., Labollita, H.A. 2010. Control de floraciones algales en los embalses de la Cuenca del Río Negro. VI Congreso Argentino de presas y aprovechamientos hidroeléctricos. Neuquén, 3-6 noviembre 2010.
- Ott, J.L., Carmichael, W.W. 2006. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues. *Toxicol.* 47, 734-741.
- Pang, K.Y., Bresson, J.L., Walker, W.A. 1987. Development of gastrointestinal surface, VIII. Lectin identification. *Am. J. Physiol. Gastr. L.* 252 (5), 685-691.
- Pavlova, V., Georgieva, L., Paunova, T., Stoitsova, S., Nikolova, E. 2013. Carbohydrate localization in intestinal glycocalyx. *Sci. Tech.* 3(1), 17-21.
- Paz-Yepes, J., Brahamsha, B., Palenik, B. 2013. Role of a Microcin-C-like biosynthetic gene cluster in allelopathic interactions in marine *Synechococcus*. *PNAS Early Edition.* 1-6.
- Pinho, G.L.L., Moura da Rosa, C., Yunes, J.S., Luquet, C.M., Bianchini, A., Monserrat, J.M. 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Phys. C* 135, 459-468.
- Pflugmacher, S. 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol.* 17, 407-413.
- Pflugmacher, S., Amé, V., Wiegand, C., Steinberg, C. 2001. Cyanobacterial toxins and endotoxins-their origin and their ecophysiological effects in aquatic organisms. *Wasser y Boden*, 53/4, 15-20.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A. 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527-533.
- Pose, M., Granata, F., O' Farrell, I., Luquet, C. 2008. Análisis de Cianobacterias y su toxicidad en el río Quilquihue, provincia del Neuquén. IV Congreso Argentino de Limnología. Bariloche, 10/2008 (CAL IV).

- Poste, A.E., Hecky, R.E., Guildford, S.J. 2011. Evaluating microcystin exposure risk through fish consumption. *Environ. Sci. Technol.* 45 (13), 5806-5811.
- Prieto, A.I., Atencio, L., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, A., Moreno, I., Cameán, A.M. 2008. Efectos tóxicos producidos por las microcistinas en peces. *Revista de Toxicología* 25 (1-3), 22-31.
- Puig, A., 1992. Estructura espacial y temporal de la taxocenosis de entomostracos (Crustacea) limnéticos en el embalse Ramos Mexía (provincia del Neuquén y de Río Negro, Argentina). Tesis doctoral en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Qiu, T., Xie, P., Ke, Z., Li, L., Guo, L. 2007. In situ studies on physiological and biochemical responses of four fishes with different trophic levels to toxic cyanobacterial blooms in a large Chinese lake. *Toxicon* 50, 365-376.
- Råbergh, C.M.I., Bylund, G., Eriksson, J.E. 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat. Toxicol.* 20, 131-146.
- Rebberor, J.F., Connolly, G.C., Henson, J.H., Boyer, J.L. Ballatori, N. 2000. ATP-dependent GSH and glutathione S-conjugate transport in skate liver: role of an Mrp functional homologue. *Am. J. Physiol. Gastr. L.* 279, 417-425.
- Redzic, Z. 2011. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS* 8 (3), 1-25.
- Reichel, V., Masereeuw, R., van den Heuvel, J.J.M.W., Miller, D.S., Fricker, G. 2007. Transport of a fluorescent cAMP analog in teleost proximal tubules. *Am. J. Physiol. Reg. I.* 293, 2382-2389.
- Rindler, M.J., Traber, M.G. 1988. A specific sorting signal is not required for the polarized secretion of newly synthesized proteins from cultured intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 107, 471-479.
- Ringuelet, R. 1955. Panorama zoogeográfico de la provincia de Buenos Aires. *Notas del Museo, Zoología* 18 (156), 1-17.
- Ritz, V., Marwitz, J., Sieder, S., Ziemann, C., Hirsch-Ernst, K.I., Quentin, I., Steinfelder, H.J. 1999. Contribution of *mdr1b*-type P-glycoprotein to okadaic acid resistance in rat pituitary GH3 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 360 (2), 116-21.

- Rivasseau, C., Martins, S., Hennion, M.C. 1998. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 799 (1-2), 155-69.
- Roset, J., Aguayo, S., Muñoz, M.J. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. *Rev. Toxicol.* 18, 65-71.
- Ross, C., Santiago-Vázquez, L., Pau, V. 2006. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat. Tox.* 78, 66-73.
- Rosso, L., Sedan, D., Kolman, M., Caixach, J., Flores, C., Oteiza, J.M., Salerno, G., Echenique, R., Giannuzzi, L., Andrinolo, D. 2014. *Microcystis aeruginosa* strain [D-Leu¹] Mcyst-LR producer, from Buenos Aires province, Argentina. *J.Coastal Life Med.* 2 (4), 287-296.
- Ruiz, M., Rodríguez, M.I., Ruibal, A. L., Gonzalez, I., Pellicioni, P., Biagi, M., Lerda, D. 2010. Efectos en la salud por exposición al agua con microcistinas. III Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua, 6 al 8 de Octubre 2010, Córdoba, Argentina.
- Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S-M., Lee, E.Y.C., Zhang, L. 1995. *In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem. Bioph. Res. Com.* 216 (1), 162-169.
- Runnegar, M.T., Kong, S., Berndt, N. 1993. Protein phosphatase inhibition and *in vitro* hepatotoxicity of MCYSTs. *Am. J. Physiol.* 265, 224-230.
- Runnegar, M.T., Seward, D.J., Ballatori, N., Crawford, J.M., Boyer, J.M. 1999. Hepatic toxicity and persistence of ser/thr protein phosphatase inhibition by microcystin in the little skate *Raja erinacea*. *Toxicol. Apl. Pharm.* 161, 40-49.
- Russel, F.G., Koenderink, J.B., Masereeuw, R. 2008. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 200-207.
- Rust, M.B. 2002. Chapter 7: Nutritional Physiology. In: *Fish Nutrition*, Rust M.B. (Ed.) third edition, Elsevier Science, USA, 807 pp.
- Sabatini, S.E. 2010. Toxicocinética de contaminantes en organismos acuáticos. Su bioacumulación, efectos mecanismos de acción. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Buenos Aires. Argentina, 241 pp.

- Sabatini, S.E., Brena, B.M., Luquet, C.M., San Julián, M., Pirez, M., Ríos de Molina, M.C. 2011. Microcystin accumulation and antioxidant responses in the freshwater clam *Diplodon chilensis* patagonicus upon subchronic exposure to toxic *Microcystis aeruginosa*. *Ecotox. Environ. Safe.* 74 (5), 1188-1194.
- Sahin, A., Tencalla, F.G., Dietrich, D.R., Naegeli, H. 1996. Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. *Toxicology* 106, 123-130.
- Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F., K. Kaya. 1992. A method for micro-determination of total microcystin content in waterblooms of cyanobacteria (blue-green algae). *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 49, 163-170.
- Sauerborn Klobučar, R., Žaja, R., Franjević, D., Brozović, A., Smital, T. 2010. Presence of ecotoxicologically relevant Pgp and mrp transcripts and proteins in cyprinid fish. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 61, 175-182.
- Schumacher, U., Duku, M., Katoh, M., Jörnsm J., Krause, W.J. 2004. Histochemical similarities of mucins produced by Brunner's glands and pyloric glands: a comparative study. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 278 (2), 540-50.
- Schwarzenberger, A., Sadler, T., Motameny, S., Ben-Khalifa, K., Frommolt, P., Altmüller, J., Konrad, K., von Elert, E. 2014. Deciphering the genetic basis of microcystin tolerance. *BMC Genomics* 15 (776), 1-9.
- Sivonen, K., Jones, G. 1999. Chapter 3: Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.*, first ed. WHO, New York, NY, 400 pp.
- Smith, J.L., Boyer, G.L., Zimba, P.V. 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture* 280, 5-20.
- Smith, J.L., Haney, J.F. 2006. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* 48, 580-589.
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A.M., Vega, R.L., Epel, D., 2004. Emerging contaminants-pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutat. Res.* 552 (1-2), 101-117.

- Soares, R.M., Magalhães, V.F., Azevedo, S.M. 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 70, 1-10.
- Sotton, B., Guillard, J., Bony, S., Devaux, A., Domaizon, I., Givaudan, N., Crespeau, F., Huet, H., Anneville, O. 2012. Impact of Toxic Cyanobacterial Blooms on Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*): Experimental Study and In Situ Observations in a Peri-Alpine Lake. *PLoS ONE* 7(12), e52243, 1-12.
- Spicer, S.S., Schulte, B.A. 1992. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1-38.
- Sturm, A., Cravedi, J.P., Segner, H. 2001. Prochloraz and nonylphenol diethoxy-late inhibit an *mdr1*-like activity *in vitro*, but do not alter hepatic levels of P-glycoprotein in trout exposed *in vivo*. *Aquat. Toxicol.* 53, 215-228.
- Suárez Isla, B.A., Guzmán Méndez, L. 1999. Floraciones de algas nocivas: Mareas Rojas y Toxinas Marina. Eds. Suárez-Isla, B. A. y Guzmán, L. Santiago de Chile, 77 pp.
- Sussman-Turner, C., Renfro, J.L. 1995. Heat-shock-stimulated transepithelial daunomycin secretion by flounder renal proximal tubule primary cultures. *Am. J. Physiol.* 268, 135-144.
- Takano, M., Yumoto, R., Murakami, T. 2006. Expression and function of effluxdrug transporters in the intestine. *Pharmacol. Ther.* 109, 137-161.
- Takenaka, S. 2001. Covalent glutathione to cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione-S transferase. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9, 135-139.
- Tencalla, F., Dietrich, D. 1997. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol.* 35, 583-595.
- Tencalla, F.G., Dietrich, D.R., Schlatter, C. 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 30 (3), 215-224.
- Therien, A.G., Blostein, R. 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, 541-566.
- Toivola, D.M., Goldman, R.D., Garrod, D.R., Eriksson, J.E. 1997. Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments. *J. Cell Sci.* 110, 23-33.

- Toporowska, M., Pawlik-Skowrońska, B. 2014. Four-year study on phytoplankton biodiversity in a small hypertrophic lake affected by water blooms of toxigenic cyanobacteria. *Pol. J. Environ. Stud.* 23 (2), 491-499.
- van de Kerkhof, E. 2007. Drug metabolism in human and rat intestine: An *in vitro* approach. Gildeprint Drukkerijen, Enschede, The Netherlands, 207 pp.
- Vasconcelos, V., Oliveira, S., Teles, F.O., 2001. Impact of a toxic and a nontoxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii*. *Toxicon* 39, 1461- 1470.
- Vasconcelos, V.M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Namikoshi, M. 1996. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in portuguese freshwaters. *Wat. Res.* 30 (10), 2377-2384.
- Venturino, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Cocca, C., Bergoc, R.M., Pechen de D'Angelo, A.M. 2001. Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comp. Biochem. Phys. C* 130, 191-198.
- Vigliano, F.A., Muñoz, L., Hernández, D., Cerutti, P., Bermúdez, R., Quiroga, M.I. 2011. An immunohistochemical study of the gut neuroendocrine system in juvenile pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes). *J. Fish Biol.* 78, 901-911.
- Vila, I., Soto, D. 1981. Atherinidae (Pisces) of Rapel Reservoir, Chile. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 21, 1334-1338.
- Villanueva, S.M.M., Ruiz, M.L., Luquita, M.G., Sánchez-Pozzi, E.J., Catania, V.A., Mottino, A.D. 2005. Involvement of Mrp2 in hepatic and intestinal disposition of dinitrophenyl-S-glutathione in partially hepatectomized rats. *Toxicol. Sc.* 84, 4-11.
- Vinagre, T.M., Alciati, J.C., Regoli, F., Yunes, J.S., Bianchini, A., Monserrat, J.M. 2003. Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Phys. C.* 135, 67-75.
- Wacklin, P., Hoffmann, L., Komárek, J. 2009. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* 9 (1), 59-64.
- Wang, M., Chan, L.L., Si, M., Hong, H., Wang, D. 2010a. Proteomic analysis of hepatic tissue of Zebrafish (*Danio rerio*) experimentally exposed to chronic microcystin-LR. *Toxicol. Sci.* 113 (1), 60-69.
- Wang, M., Wang, D., Lin, L., Hong, H. 2010b. Protein profiles in zebrafish (*Danio rerio*) brains exposed to chronic microcystin-LR. *Chemosphere* 81, 716-724.

- Welker, M., Fastner, J., Erhard, M., von Döhrren, H. 2002. Applications of MALDI-TOFMS analysis in cyanotoxin research. *Environ. Toxicol.* 17, 367-374.
- Wenzel, M.T., Díaz, M.M. 2008. Cyanophyta del Parque Nacional Nahuel Huapi. (Argentina), II. *Darwiniana* 46 (1), 51-65.
- Wiegand, C., Peuthert, A., Pflugmacher, S., Carmeli, S. 2002. Effects of Microcin SF608 and Microcystin-LR, Two Cyanobacterial Compounds Produced by *Microcystis* sp., on Aquatic Organisms. *Environ. Toxicol.* 17, 400-406.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203,201-218.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, K.A., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A. 1999. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 14, 89- 95.
- Williams, D.E., Craig, M., Dawe, S.C., Kent, M.L., Holmes, C.F.B., Andersen, R.J. 1997a. Evidence for a Covalently Bound Form of Microcystin-LR in Salmon Liver and Dungeness Crab Larvae. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 463-469.
- Williams, D.E., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.J., Craig, M., Holmes, C.F.B. 1997b. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and *in vivo* evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon* 35 (11), 1617-1625.
- Williams, D.E., Kent, M.L., Andersen, R.J., Klix, H., Holmes, C.F.B. 1995. Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin-LR epimers administered to Atlantic. *Toxicon* 33 (2), 125-131.
- Xie, L., Xie, P., Guo, L., Li, L., Miyabara, Y., Park, H-D. 2005. Organ Distribution and Bioaccumulation of Microcystins in Freshwater Fish at Different Trophic Levels from the Eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ. Toxicol.* 20, 293-300.
- Xie, L., Xie, P., Ozawa, K., Honma, T., Yokoyama, A., Park, H.D. 2004. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environ. Pollut.* 127, 431-439.
- Yuan, M., Carmichael, W.W., Hilborn, E.D. 2006. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. *Toxicon* 48 (6), 627-640.

- Zaja, R., Munić, V., Sauerborn Klobučar, R., Ambriović-Ristov, A., Smital, T., 2008. Cloning and molecular characterization of apical efflux transporters (ABCB1, ABCB11 and ABCC2) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat.Toxicol.* 90, 322–332.
- Zamek-Gliszczyński, M.J., Hoffmaster, K.A., Nezasa, K., Tallman, M.N., Brouwer, K.L.R. 2006. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 447–486.
- Zanchett, G., Oliveira-Filho, E.C. 2013. Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effects. *Toxins* 5, 1896-1917.
- Zanuzzi, C.N., Barbeito, C.G., Ortíz, M.L., Lozza, F.A., Fontana, P.A., Portiansky, E.L., Gimeno, E.J. 2010. Glycoconjugate histochemistry in the small and large intestine of normal and *Solanum glaucophyllum*-intoxicated rabbits. *Res. Vet. Sci.* 89, 214-222.
- Zar, H.J. 1999. *Biostatistical Analysis*, fourth Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 944 pp.
- Zhang, D., Xie, P., Liu, Y., Qiu, T. 2009. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Sci. Total Environ.* 407, 2191-2199.
- Zhang, D., Yang, Q., Xie, P., Deng, X., Chen, J., Dai, M., 2012. The role of cysteine conjugation in the detoxification of microcystin-LR in liver of bighead carp (*Aristichthys nobilis*): a field and laboratory study. *Ecotoxicology* 21, 244–252.
- Zhang, H., Zhang, J., Hong, Y., Chen, Y. 2007. Evaluation of organ distribution of microcystins in the freshwater phytoplanktivorous fish *Hypophthalmichthys molitrix*. *Journal of Zhejiang University, SCIENCE B* 8 (2), 116-120.
- Zilliges, Y., Kehr, J.-C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Hagemann, M., Kaplan, A., Börner, T., Dittmann, E. 2011. The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS ONE* (6) 3 e17615

ANEXO I

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	VOLUMEN
A	0,85 g NaNO ₃ + 0,2 g MgCl ₂ .6H ₂ O + 0,25 g MgSO ₄ .7H ₂ O + 0,15 g CaCl ₂ .2H ₂ O / 100 mL	20 mL
B	0,87 g K ₂ HPO ₄ + 1,33 g Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O / 100 mL	2 mL
C	2,48 g H ₃ BO ₃ + 1,39 g MnCl ₂ .4H ₂ O + 1,08 g FeCl ₃ .6H ₂ O + 0,335 g ZnCl ₂ + 0,019 g CoCl ₂ .6H ₂ O + 0,0014 g CuCl ₂ / 100 ML	0,1 mL
D	1,86 g EDTA.Na ₂ / 100 mL	0,4 mL
Agua		77,5 mL

Tabla 1. Composición del medio de cultivoo ASM-1 (extraído de Gorham et al., 1964).

SOLUCION CORTLAND	
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mM)
NaCl	159,9
KCl	2,55
CaCl ₂	1,56
MgSO ₄	0,93
NaHCO ₃ *	5
NaH ₂ PO ₄	2,97
Glucosa*	5,55
pH solución 7,8	

*Tabla 2. Composición de la solución salina Cortland (extraído de Daborn et al., 2001 con ligeras modificaciones). *estos compuestos se agregaron al momento de utilizar la solución.*

ANEXO II

Western Blot

En muestras de intestino de *O. hatcheri* y *O. mykiss* se intentó detectar la presencia de los transportadores Abcc2 y Abcb1, utilizando anticuerpos para proteínas de mamíferos Anti-ABCC2 mAb (M2III-6) y Anti-Mdr (H-241): sc-8313 (utilizados en inmunohistoquímica, capítulo III). Ambos anticuerpos se recomiendan para esta técnica en mamíferos. Con las muestras de peces utilizadas no se obtuvieron resultados positivos.

El protocolo desarrollado se llevó a cabo parte en el CEAN y parte en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE), Universidad Nacional de Rosario, en colaboración con la Dra. Silvina S.M. Villanueva.

Las muestras de intestino se homogeneizaron en buffer (NaCl 140 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6) junto con inhibidores de proteasas (3 mL de buffer por cada gramo de tejido). Se mezclaron 500 μ L de este homogenato con 500 μ L de solución Tritón X-100 al 2%. Se incubó a 4 °C durante 20 minutos agitando en vortex cada 5 minutos. Se centrifugó a 30000 g durante 30 minutos a 4 °C. Se separó el sobrenadante para utilizarlo en la cuantificación de proteínas y en la detección por Western Blot.

La técnica de Western Blot se realizó según se describe en Mottino et al. (2000). Las muestras fueron sembradas en geles de poliacrilamida-SDS 10% los cuales fueron sometidos a electroforesis en un buffer compuesto por glicina 0,2 M, Tris 25 mM, SDS 0,1% (m/v) a un voltaje de 110 V durante 15 minutos, luego de lo cual se aplicaron 150 V hasta completar la corrida. Una vez finalizada la corrida electroforética se realizó la transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (HybondTM-ECLTM, Amersham Biosciences, CA, USA). La transferencia se realizó en buffer de transferencia compuesto por Tris 20 mM,

glicina 150 mM, SDS 0,03% (m/v), metanol 20% (v/v) durante 90 minutos a una corriente constante de 35 mA a 4°C.

Luego de la transferencia, las membranas se bloquearon durante toda la noche en buffer de lavado (PBS 1X y Tween-20 0,3% v/v), con 10% (m/v) de leche en polvo descremada, a 4°C. Al día siguiente, se agregó el anticuerpo primario (anti-MRP2 dilución 1:1000; Anti-MDR1 dilución 1:1000) y se incubaron las membranas durante toda la noche. Luego, se realizaron 3 lavados de 7 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario apropiado y conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 3 lavados de 7 minutos. El revelado se realizó usando un reactivo quimioluminiscente (ECL1Plus; Amersham Pharmacia Biotech, Inc) expuesto a Bio-Max MR-2 film (Sigma Chemical Co.) por un tiempo adecuado.

ANEXO III

Para el alineamiento de las secuencias de aminoácidos se utilizaron los software: Vector NTI (Invitrogen) y AlignX.

La base de datos de la cual se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de proteínas ABC de peces fue: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

Project Edit View Align Analyses Assemble Tools Window Help

Active Pane: **Abcc4 Poecilia Reticulata (1322)**

- General Description
- Standard Fields
- Analysis
- Abcc4 Danio Rerio (1327)
- Abcc4 N.coriticeps (1320)
- Anti-Abcc4 ab77184 (15)

Abcc4 Poecilia Retic... (0.421)

Abcc4 Danio Rerio (0.889)

1187	Anti-Abcc4 ab77184	1	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320	13	
1178	Abcc4 Poecilia Reticulata		SNFSVGRQLVCLARAILR	NRLLIIDEATANVDPRTDELIQTIIRDKFK	ECTVLIIAHRLNTIIDSRLIIVDAG	QIHADEPH	LLQDTKGFYKMWQQTG	QEARA	IREARRAYDSRRP	SVYNGWDRANV	LIIFETAL	-----	-----	-----	-----	-----	CNGQPS	LIIFETAL
1180	Abcc4 N.coriticeps		SNFSVGRQLVCLARAILR	NRLLIIDEATANVDPRTDS	LIQTIIRDKFKECTVLIIAHRLNTIIDS	RLIIVDAGRIQ	EVYDEP	VLLQNGE	FFYVMVQQTG	SEAAASLLI	HTA	SOVYIN	---	---	---	---	KRV	VDHCKADIIHVFETSL
1183	Abcc4 Danio Rerio		SNFSVGRQLVCLARAILR	KNRLLIIDEATANVDPRTDELIQ	TIIRDKFKECTVLIIAHRLNTIIDS	RLIIVDAGRIHEVIA	PHVLLQNG	SFFYKMWQQTG	GAEN	ELLQTAQAV	NRSP	PAHQ	INGFATT	CGS	LIIFETAL			
Consensus		1187	SNFSVGRQLVCLARAILRNRLLIIDEATANVDPRTDELIQTIIRDKFKECTVLIIAHRLNTIIDSRLIIVDAGRIHEVDEPHVLLQNG GIFFYKMWQQTGSEAAASLL TAKQAV NRS LNG V AD SIVLIFETAL															
			consensus positions: 93.8% identity positions: 0.4% alm: 1230															

